

HELDER ELÍSIO EVANGELISTA VIEIRA

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE *PtSRP*, UM
POTENCIAL CONTROLADOR DA FORMAÇÃO DE
ECTOMICORRIZAS**

RECIFE

2016

HELDER ELÍSIO EVANGELISTA VIEIRA

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE *PtSRP*, UM POTENCIAL
CONTROLADOR DA FORMAÇÃO DE ECTOMICORRIZAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientadora:

Dr.^a. Leonor Costa Maia (UFPE)

Co-orientador:

Dr. Bartolomeu Acioli dos Santos (CPqAM/FIOCRUZ)

RECIFE

2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Vieira, Helder Elísio Evangelista

Clonagem e expressão do gene PtSRP, um potencial controlador da formação de ectomicorrizas/ Helder Elísio Evangelista Vieira – Recife: O Autor, 2016.

142 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Leonor Costa Maia

Coorientador: Bartolomeu Acioli dos Santos

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Ciências Biológicas. Ciências Biológicas, 2016.

Inclui referências

- 1. Fungos ectomicorrízicos 2. Simbiose 3. Genes I. Maia, Leonor Costa (orientadora) II. Santos, Bartolomeu Acioli dos (coorientador) III. Título**

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-085

HELDER ELÍSIO EVANGELISTA VIEIRA

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE *PtSRP*, UM POTENCIAL
CONTROLADOR DA FORMAÇÃO DE ECTOMICORRIZAS**

Tese de doutorado defendida e apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, em 05 de julho de 2013.

BANCA EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES:

Prof^ª. Dr^ª. Leonor Costa Maia
(Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Prof^ª. Dr^ª. Maria Tereza dos Santos Correia
(Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Prof^ª. Dr^ª. Elaine Malosso
(Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Prof^ª. Dr^ª. Neiva Tinti de Oliveira
(Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Prof^ª. Dr^ª. Cíntia Renata Costa Rocha
(Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA)

Prof. Dr. Christian Robson de Souza Reis
(CPqAM - Fiocruz-PE)

*“E se tudo estiver perdido... ainda assim vale a pena continuar.
Basta pensar no caminho percorrido até aqui”.*

Helder Vieira

OFEREÇO:

Aos meus pais José Vieira de Araújo e Tilda Evangelista Vieira, por estarem sempre comigo no enfrentamento das dificuldades, me dando apoio e me incentivando a seguir em frente. Esse apoio diário foi imprescindível para que a minha caminhada até aqui fosse possível. Amo vocês!

IN MEMORIAM:

De minha avó Angelita Evangelista Vieira, pelo legado de uma vida inteira dedicada à família. Por me doar um amor incondicional e por sempre torcer pela minha felicidade. Através das lembranças, permanecerá viva para sempre em meu coração.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Ciências Biológicas pela oportunidade e a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pelos ensinamentos compartilhados em especial à Coordenadora, Prof^a. Dr^a Maria Teresa Correia, pelo apoio na execução deste projeto.

À Prof^a. Dr^a. Leonor Costa Maia pelo aceite da orientação, por me acolher no Laboratório de Micorrizas e pelos ensinamentos em Micologia. Por sempre me dar apoio e ter paciência nos diversos momentos de dificuldade, ao longo desses quatro anos de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Bartolomeu Acioli dos Santos por ter me confiado à execução deste projeto. Pela co-orientação e amizade ao longo de todos esses anos. Por estar diariamente me acompanhando no enfrentamento das dificuldades.

À Prof^a.Dr^a. Cláudia Lima pelo apoio, colaboração e ensinamentos acerca das ectomicorrizas. Também pela amizade construída ao longo desses anos.

Ao Centro de Pesquisas Ageu Magalhães/Departamento de Virologia e Terapia Experimental (Lavite) na pessoa do Chefe deste Departamento o Prof. Dr. Rafael Dália por disponibilizar as dependências do Laboratório para a execução das etapas de clonagem, expressão da PtSRP e imunolocalização. Também a todos os técnicos, funcionários e pesquisadores deste centro de pesquisa, pela ajuda e troca de experiências importantes na minha formação profissional e no desenvolvimento do projeto.

Ao Departamento de Microbiologia do Aggeu Magalhães, em especial ao Prof. Dr. Christian Reis pela colaboração nas etapas de expressão e purificação da PtSRP e valiosas contribuições na discussão do artigo.

À Unidade de Biologia Molecular e Biotecnologia Vegetal (ICAT) da Faculdade de Ciências/Universidade de Lisboa-Portugal, pelo fornecimento e envio do isolado ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pt-103), meu objeto principal de estudo.

A toda a minha família e em especial aos meus pais, José Vieira de Araújo e Tilda Evangelista Vieira, aos meus irmãos, Heron e Harlan e Tia Rosa, pelo carinho e incentivo para que eu pudesse concluir mais esta etapa.

A todos os meus amigos, que durante estes quatro anos, de alguma forma acompanharam essa difícil jornada e vibraram quando cada etapa era vencida. Em

especial quero agradecer a Gladyston Gydione Bezerra da Silva por participar ativamente na minha vida e sempre me incentivar a seguir em frente, mesmo nos momentos mais difíceis.

A todos os colegas da turma de doutorado, em especial às amigas Clarissa Isabel e Suanni Lemos pela amizade verdadeira construída ao longo desses anos.

A todos do Departamento de Micologia, em especial aos que compõem o Laboratório de Micorrizas e às Prof^{as}. Uided Maaze e Elaine Malosso pelas conversas informais e troca de experiências tão valiosas.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco – FACEPE, pela concessão da bolsa e auxílio financeiro em minha estada em São Paulo quando realizei um estágio de três meses no Departamento de Microbiologia - USP.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

RESUMO

Numa ectomicorriza, a fase pré-simbiótica é um período crucial na determinação da compatibilidade entre o fungo e o seu hospedeiro vegetal para o sucesso e estabelecimento da simbiose. Embora a associação tenha sido amplamente documentada do ponto de vista funcional/ecológico, informações acerca dos genes/proteínas envolvidos no início da interação ainda são escassas. O gene *PtSRP* é sobreexpresso entre 6-12h do pré-contato entre *Pisolithus tinctorius*-*Castanea sativa* e estudos *in silico* demonstraram que sua proteína apresenta região inicial hidrofóbica transmembranar em alfa-hélice seguida de seis fitas-beta intercaladas por *loops*. Por essas características foi especulado que esse peptídeo (127 a.a e 13,969 kDa) poderia estar relacionado à sinalização/controlado das fases iniciais de formação/desenvolvimento da simbiose. Este trabalho objetivou a clonagem da ORF, expressão e purificação da *PtSRP* e a produção de anticorpos policlonais anti-*PtSRP* para serem usados na imunolocalização da proteína em *P. tinctorius*. A ORF mais provável do *PtSRP* foi amplificada por PCR com o uso de iniciadores adicionados de sítios de restrição para *EcoR1* e *Xho1*. Os fragmentos foram clonados em vetor comercial pJET1.2 e a ORF subclonada em vetor de expressão pET21D(+), previamente tratado com as respectivas enzimas. Essa nova construção do vetor foi utilizada para transformar bactérias de expressão BL-21 Star. A *PtSRP* foi então expressa em larga escala sob ação do indutor IPTG a 0,1 mM e purificada com e sem o uso de ureia. As proteínas purificadas foram utilizadas na produção de anticorpos anti-*PtSRP*, em coelhos *Oryctolagus curiculus*, imunizados com quatro pulsos de 150µg da *PtSRP*. Após a sangria total, o soro foi coletado, os anticorpos purificados e testados quanto à sensibilidade e especificidade no reconhecimento da *PtSRP* por *western blot*. A partir do microcultivo em lâmina de *P. tinctorius*, o micélio foi submetido aos testes de imunolocalização com uso de anticorpos primários conformacionais anti-*PtSRP* obtidos nos ensaios anteriores e os anticorpos secundários Alexa Fluor 488 nm Goat anti-rabbit IgG. Para o controle negativo o micélio foi incubado na ausência do anticorpo primário anti-*PtSRP*. Na imunofluorescência convencional, o micélio foi observado em microscópio Leica DMI 4000B/objetiva 63x e os campos analisados foram escolhidos de acordo com a dispersão/morfologia das hifas, sendo as imagens capturadas e digitalizadas pelo acoplamento de um computador à câmera digital do microscópio. Na microscopia confocal as imagens foram adquiridas com objetiva de 63x/laser 488nm/ óleo de imersão, sendo capturadas e digitalizadas através do acoplamento de computador à câmera digital do microscópio Leica TCS SP2. Os resultados de expressão em sistema procarioto demonstraram que o peptídeo possui massa de 16 kDa o que confirmou as análises de predição anteriores. Na microscopia de fluorescência convencional houve forte marcação da *PtSRP* ao longo de toda a hifa, especialmente na região correspondente à membrana. A microscopia confocal identificou a marcação da *PtSRP* principalmente na periferia da hifa, mais especificamente na região correspondente à parede celular/membrana, inclusive no grampo de conexão (estrutura típica dos Basidiomycota). Esses achados coincidem com propriedades de outras proteínas fúngicas envolvidas na formação e reconhecimento das ectomicorrizas (SRAPs e hidrofobinas) que têm localização membranar. Estudos adicionais como nocaute gênico ou utilização de RNAs de interferência serão fundamentais para melhor compreensão do papel fisiológico da *PtSRP* na simbiose ectomicorrízica.

Palavras-chave: Expressão gênica, fungos ectomicorrízicos, gene *PtSRP*.

ABSTRACT

In ectomycorrhiza, the pre-symbiotic period is crucial to determine the compatibility between the fungus and its host plant for the success and establishment of symbiosis. Although the association is widely documented, information about the genes/proteins involved in the early period interaction are still missing. The *PtSRP* gene is overexpressed 6-12h of pre-contact between *Pisolithus tinctorius*-*Castanea sativa* and *in silico* studies have shown that PtSRP protein present a initial region hydrophobic transmembrane in alpha-helix followed by a six-sheet interspersed by loops . For these characteristics it has been speculated that this peptide (127 aa and 13,969 kDa) could be related to signaling/control of the early stages of symbiosis development. This work aimed to clone the ORF, to express and purify the PtSRP as well the polyclonal anti-PtSRP production for use in *P. tinctorius* protein immunolocalization. The most PtSRP ORF was amplified by PCR using primers with restriction sites (Xho1 and EcoR1). The amplified fragments were cloned into pJET1.2 vector and the ORF was subcloned into pET21D (+)expression vector previously treated with these respective enzymes. This new vector was used to transform BL-21 Star bacterial expression. The PtSRP was then expressed in large scale under the action of inductor 0.1 mM IPTG and purified with and without the use of urea. The purified proteins were used to produce antibodies PtSRP, in *Oryctolagus curiculus* rabbits immunized with four pulses of 150µg PtSRP. After total bleeding, the serum was collected, and purified antibodies tested for their sensitivity and specificity in recognition of PtSRP by western blot. From the *P. tinctorius* microculture, the mycelium was submitted to immunolocalization tests using primary conformational-antibodies anti- PtSRP obtained in previous trials and the secondary antibodies Alexa Fluor 488 nm goat anti-rabbit IgG. For the negative control the mycelium was incubated in the absence of primary anti-PtRSP. In conventional immunofluorescence, the mycelium was observed in a 4000B/objetiva 63x Leica DMI and the analyzed fields were chosen according to the morphology of hyphae, and the images were captured and digitized by coupling a computer to a microscope digital camera. In confocal microscopy images were acquired with the objective 63x/laser 488nm / immersion oil being captured and digitized by coupling a computer to a Leica TCS SP2 microscop digital camera. The results in the prokaryotic expression system showed that the peptide has a mass of 16 kDa which confirm earlier prediction analyzes. In conventional fluorescence microscopy there was a strong marking PtSRP throughout the hyphae, especially in the membrane region. Confocal microscopy identified marking PtSRP mainly in the periphery of hyphae, and more specifically the region corresponding to the cell wall / membrane, including the clamp connection (typical structure of Basidiomycota). These findings are consistent with properties of other fungal proteins involved in the formation and recognition of ectomycorrhizal (SRAPs and hydrophobins) that have membrane localization. Additional studies such as gene knockout or use of interfering RNAs are essential for better understanding of the physiological role of PtSRP in ectomycorrhizal symbiosis.

Keywords: gene expression, ectomycorrhizal fungi, PtSRR1.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A -adenina	mmol -milimol
Aa -aminoácidos	mRNA -RNA mensageiro
AIA -ácido indol acético	NCBI –National Center for biotechnology Information
A230 -absorvância a 230 nm	ng -nanograma
A260 -absorvância a 260 nm	nm -nanômetro
A280 -absorvância a 280 nm	ORF –open reading frame
AMP - ampicilina	PCR –reação em cadeia da polimerase
ATP -adenosina 5'- trifosfato	pb –pares de base
BSA -albumina sérica bovina	pH -expoente de íons de hidrogênio
cm -centímetro	<i>PtSRR1</i> –gene <i>Pisolithus tinctorius</i> <i>symbiosis related receptor 1</i>
cDNA -DNA complementar	<i>PtSRR1</i> –proteína codificada do gene <i>PtSRR1</i>
CEUA -Comitê de ética para uso de animais	pM -picomolar
°C -graus Celsius	Poly (A +) -poliadenilado (mRNA)
DEPC -dietilpirocarbonato	RACE -amplificação rápida das extremidades de cDNA
DNA -ácido desoxirribonucleico	RNA -ácido ribonucleico
DO -densidade óptica	RNase -ribonuclease
EDTA -ácido etilenodiamina tetra- acético	rpm -rotações por minuto
EST -expressed sequence tag	RT -transcriptase reversa
ECL - <i>enhanced chemiluminescence</i>	SRAPs –symbiosis related acid proteins
ELISA - <i>enzyme-linked immunosorbent</i> <i>assay</i>	SDS -sulfato de sódio dodecil
G –guanine	s -segundos
FMA –fungo micorrízico arbuscular	<i>Taq</i> - <i>Thermus aquaticus</i>
g -grama	TAE - Tris-acetato-EDTA
IPTG -isopropil-1-thio-P- D- galactopiranosídeo	t-RNA -ácido ribonucleico de transferencia
Kg -quilograma	U -unidades de enzima
kDa -kilodáltons	UTR –regiões não traduzíveis
LB -Luria-Bertani	UV -ultra-violeta
M -molaridade	V -volts
Ma –milhões de anos	v/v -volume por volume
MCS -sítio de clonagem múltipla	W -watt
mg -miligrama	µg -micrograma
Mha –milhões de hectare	µl -microlitro
min –minuto	µM -micromolar
ml -mililitro	SDS-PAGE -dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida
mm –milímetro	
MNM – Melin-Norkrans Modificado	
mM -milimolar	

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Diversidade do padrão de ramificação lateral de raízes de plantas colonizadas por diferentes fungos ectomicorrízicos. **A.** Ramificação do tipo monopodial-pinada da ectomicorriza formada por *Truncocolumella citrina-Pseudotsuga menziesii*. **B.** Um denso agrupamento das raízes (monopodial-pinada e monopodial-piramidal) da ectomicorriza de *Rhizopogon flavofibrillosus-Pseudotsuga menziesii*. **C.** Um sistema múltiplo de raízes dicotômicas na ectomicorriza formada entre *Thelephora terrestris-Pinus ponderosa*. **D.** Denso agrupamento de raízes de *Fagus grandifolia* associadas com espécies de fungos desconhecidos (PETERSON et al., 2004)..... 29
- Figura 2.** **A.** Diagrama de ectomicorriza em corte transversal ilustrando as características das Angiospermas (porção da esquerda) e coníferas (porção direita). Ambos apresentam o manto (m), Rede de Hartig (setas curtas), micélio externo (setas longas). A principal diferença entre esses dois sistemas é que a Rede de Hartig nas Angiospermas é restrita às células epidérmicas enquanto nas coníferas ela se forma em torno de ambas: células epidérmicas e corticais (PETERSON et al., 2004). **B.** Ectomicorriza de *Pisolithus tinctorius - Pinus pumila* em corte transversal. Legenda: (MF) manto fúngico, (RH) rede de Hartig nos espaços intercelulares do córtex (COSTA et al., 2002)..... 31
- Figura 3.** Micélio extraradical em diferentes ectomicorrizas. **A.** *Suillus bovinus* em associação com *Pinus sylvestris*. **B.** Micélio externo de *Pisolithus tinctorius* associado com *Pinus strobus* onde são observadas hifas de absorção mais delgadas (setas curtas) além de rizomorfas (setas longas). **C.** Fungo do gênero *Cenococcum* em associação com *Abies lasiocarpa* emanando um extenso micélio extraradical. (PETERSON et al., 2004)..... 32
- Figura 4.** Crescimento de *Eucalyptus grandis* inoculado com diferentes isolados de *Pisolithus* spp. (M5, 35, PT 90A). C = controle, sem inoculação (COSTA et al., 2002)..... 33
- Figura 5.** Exemplos de basidiomas epígeos, todos presumidamente ectomicorrizicos. **A.** *Amanita rubescens*; **B.** *Amanita muscaria* crescendo numa floresta mista de madeira de coníferas no sul de Quebec; **C.** *Amanita frostiana*; **D.** *Hygrophorus fuligineus*; **E.** *Russula* sp.; **F.** *Suillus grevillei*; **G.** Um representante do gênero *Leccinum*, crescendo nas proximidades de *Betula pendula*; **H.** Espécime de *Albatrellus* cf. *ovidus* crescendo sob coníferas nas montanhas rochosas canadenses; **I.** Espécime de *Cantharellus*, provável *tubaeformis*, crescendo sob um dossel, as montanhas rochosas canadenses (PETERSON et al., 2004)..... 36
- Figura 6.** Seqüência na colonização de pêlos radiculares de *Picea mariana* pelas hifas do fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*. As plantulas foram cultivadas em bolsas de crescimento e os sistemas radiculares inoculados com discos de ágar contendo

micélio de *P. tinctorius*. As raízes colonizadas foram examinadas por microscopia eletrônica de varredura (PETERSON et al., 2004)..... 40

Figura 7. Estágios do desenvolvimento *in vitro* de ectomicorriza formada pela associação de *P. involutus* com *B. pendula*, entre 0 e 21 dias de interação. As setas à esquerda indicam as extremidades radiculares da plântula sendo cobertas pelo micélio, no início da formação do manto (0-4 dias) e surgimento de radículas laterais (4-21 dias). À direita, observam-se (4º dia) duas camadas do manto diferenciado (setas com duas cabeças) e penetração das hifas entre as células do córtex do hospedeiro (setas simples). Aos oito dias, observa-se o início da formação da rede de Hartig. Aos 14 dias, vê-se a rede de Hartig plenamente desenvolvida. Aos 21 dias, uma extensa ramificação do micélio nos espaços intercelulares do córtex radicular. (LE QUÉRÉ et al., 2005 adaptado de ACIOLI-SANTOS, 2006)..... 42

CAPÍTULO II

Figure 1 - The *PtSRP* mRNA. Complete nucleotide sequence (636 bp) and its probable ORF (the codons and corresponding 127 amino acids). The ORF represents the largest translation region for the sequence. Stop codon is represented by the word “End”. Full line = new fragment obtained by RACE 5’; Interrupted line = 3’ previously reported sequence (EL563703, ACIOLI-SANTOS et al., 2009); ← = 5’ UTR; → = 3’ UTR; □ = Kozak sequence with variation and respective base positions..... 68

Figure 2 - Alignment between the RACE assembly (636 bp; A) and the directly amplified and cloned sequence (604 bp; B) indicating only two nucleotide changes in 291C/T and 306 A/C positions (#). — : *PtSRP* ORF..... 69

Figure 3 - Secondary structure prediction and transmembrane domain of the *PtSRP*. Legend: AA = amino acid sequence, *PHD_htm* = transmembrane helix prediction (M = transmembrane helix, blank spaces = non-membrane regions), *Rel_htm* = *PHD_htm* prediction reliability index (Reliable predictions are marked '*'), *PROF_sec* = secondary structure prediction (H = Helix, E = sheet, blank: “loop”), *Rel_sec* = *PROF_sec* prediction reliability index (0 = low to 9 = high), *SUB_sec* = all *PROF_sec* predictions subset, for all residues with an expected average accuracy > 82% (L = “loop”, “.” = no prediction for the residue), *O_3_acc* = observed relative solvent accessibility (b = 0-9%, i = 9-36%, e = 36-100%). *P_3_acc* = predicted relative solvent accessibility, *Rel_acc*: *P_3_acc* prediction reliability index, *SUB_acc*: *P_3_acc* prediction subset, for all residues with an average correlation > 0.69. Glycosylation sites NFSQ and NFTI = (—); phosphorylation sites TNSE and TVPD = (□). The cleavage site near to membrane is represented by (↓). Analyses were carried out in <http://www.predictprotein.org>..... 69

Figure 4 - *PtSRP* hydrophobicity analysis. A strong hydrophobic initial region is observed in the protein (Scaled by the Kyte and Doolittle, 1982)..... 70

CAPÍTULO III

- Figura 1.** Esquema da detecção enzimática por ação da peroxidase da Proteína PtSRP ligada à membrana. **a.** membrana de nitrocelulose; **b.** proteína PtSRP; **c.** Anticorpo primário anti-PtSRP com cauda de histidina; **d.** Anticorpo secundário anti-histidina associado a enzima peroxidase; **e.** enzima peroxidase; **S.** Substrato ECL; **P.** Produto da reação; **f.** emissão de luz (modificado de Clarity™ Western ECL Substrate - Instruction Manualde, Biorad)..... **93**
- Figura 2.** Aspecto macroscópico do isolado ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pt-103) em meio sólido Melin-Norkrans Modificado - MNM (MARX, 1969) (**A**). Cultivo do isolado em meio líquido e obtenção da biomassa após um mês (**B**)..... **98**
- Figura 3.** Fotodocumentação da eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio onde são observados os fragmentos PCR1 (237pb) e PCR2 (120pb) correspondentes à região 3' do mRNA do gene *PtSRP*. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram estimados com base no marcador molecular (M) 1Kb plus DNA Ladder, Invitrogen® **99**
- Figura 4.** Fotodocumentação da eletroforese em gel de agarose, TAE 1% onde são observados fragmentos de aprox. 604pb, correspondentes ao mRNA completo do gene *PtSRP* em quadruplicata (PCR1, PCR2, PCR3 e PCR4). M = Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder, Invitrogen® **100**
- Figura 5.** Alinhamento entre a sequência montada via RACE 5'(636 pb; A) e a obtida diretamente via PCR, clonagem e sequenciamento (604pb; B) indicando apenas 2 mudanças de nucleotídeos nas posições 291C/T e 306 A/C (#). — : ORF do gene *PtSRP*; (←) UTR 5' e (→) UTR 3'; (□) Início da tradução e (○) término da tradução..... **101**
- Figura 6.** Alinhamento entre as ORFs traduzidas da sequência montada via RACE 5'(636 pb; A) e a obtida diretamente via PCR (604pb; B). (*) Alinhamento perfeito; (:) Divergência no alinhamento indicando apenas 1 mudança no resíduo de aminoácidos 65 (Serina na sequência A e Treonina na sequência B)..... **101**
- Figura 7.** Sequência dos *primers* senso (Primer_PtSRPf) e anti-senso (Primer_PtSRPr) com sítios de restrição para as enzimas EcoR1 e Xho1. (Em preto= Bases adicionadas para a ancoragem da enzima de restrição; em vermelho= sítios de restrição das enzimas; em azul= sequência de anelamento complementar à região 5' e 3'da ORF do Gene *PtSRP*)..... **102**
- Figura 8.** Fotodocumentação da eletroforese em gel de agarose 1% TAE da amplificação em duplicata (PCR1 e PCR2) da ORF do gene *PtSRP* completo com sítios de restrição, onde observam-se amplicons de 401pb. M= marcador molecular 1kplus DNA Ladder - Invitrogen® **102**
- Figura 9.** Confirmação da clonagem do gene *PtSRR1* de 401pb em vetor pJET 1.2 . M= marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder - Invitrogen® **103**

Figura 10. Resultado do sequenciamento do clone 04 após edição no ApE v 1.15. Legenda: A,C,T,G= representam os nucleotídeos, _____= Representam o par de primers desenhados para a amplificação do gene <i>PtSRP</i> , em cinza= ORF do Gene <i>PtSRP</i>	104
Figura 11. Confirmação da clonagem do gene <i>PtSRP</i> de 401pb em vetor pJET 1.2. M= marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder - Invitrogen®	104
Figura 12. Digestão do vetor PET21D(+) com a enzima EcoR1 (A) e digestão do vetor PET21D(+) com a enzima XhoI (B). Confirmação da digestão dupla do vetor PET21D(+)(C). M= marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder - Invitrogen®.....	105
Figura 13. Confirmação da clonagem do Gene <i>PtSRP</i> de 401pb em vetor pET21D(+) e transformado em DH10B. M = marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder - Invitrogen®.....	106
Figura 14. Gel de eletroforese SDS-PAGE para visualização da PtSRP, expressa em sistema bacteriano. As bactérias transformadas foram crescidas em meio de cultura e induzidas a expressar as respectivas proteínas recombinantes (em pequena escala), utilizando IPTG. Os extratos bacterianos foram fracionados em gel 15% de poliacrilamida e visualizados por coloração de azul de Coomassie. M: marcador de peso molecular Precision Plus Dual Color – Biorad®, 1: BI-21 sem plasmídeo, 2: BI-21 com vetor selvagem, 3: BI-21 Star (Invitrogen®) com outra proteína, 4: Clone 1 pré-indução, 5: Clone 2 pré-indução, 6: Clone 1 pós-indução, 7: clone 2 pós-indução; (□): Fração correspondente a proteína PtSRP.....	106
Figura 15. Western blot da expressão, em pequena escala, da PtSRP em sistema bacteriano. M: marcador de peso molecular Precision Plus Dual Color – Biorad®, 1: BI-21 sem plasmídeo, 2: BI-21 com outro vetor, 3: Clone 1 pré-indução, 4: Clone 2 pré-indução, 5: Clone 1 pós-indução, 6: clone 2 pós-indução; (□): Fração correspondente da proteína PtSRP.....	107
Figura 16. Gel de eletroforese da purificação da PtSRP em condição nativa. Observa-se neste gel de 15% de poliacrilamida, a purificação da PtSRP nas suas diferentes etapas, desde a indução até a 3ª eluição. M: marcador de peso molecular Precision Plus Dual Color – Biorad®; (O): Fração correspondente da PtSRP purificada.....	108
Figura 17. Quantificação estimada através da curva da diluição seriada de BSA da PtSRP purificada sob condição nativa. M: marcador de peso molecular Precision Plus Dual Color – Biorad®, 1ª Eluição: Eluição 1 da PtSRP purificada sem ureia; Diluição seriada de BSA: quantidades de BSA correspondentes de 2 a 0,125µg.....	109
Figura 18. Gel de SDS-PAGE da purificação da PtSRP sob condição desnaturante. Observa-se neste gel de 15% de acrilamida a purificação da PtSRP com ureia, nas suas diferentes etapas, desde o sedimento inicial pós-sonicação até a 4ª lavagem. M: marcador de peso molecular Precision Plus Dual Color – Biorad®; (□): Fração correspondente da PtSRP.....	110

Figura 19. Quantificação estimada através da curva da diluição seriada de BSA da PtSRP purificada em condição desnaturante. M: marcador de peso molecular Precision Plus Dual Color – Biorad®. Diluição seriada de BSA: quantidades de BSA correspondentes de 2 a 0,125µg. Diluição seriada da PtSRP a partir da diluição de 1:4 até 1:32..... **110**

CAPÍTULO IV

Figura 1. Esquema geral do microcultivo do isolado de *Pisolithus tinctorius* (Pt-103)... **124**

Figura 2. Imunizações para a obtenção do anticorpo anti-PtSRP. (A) *Oryctolagus curiculus*; (B) Coleta da sangria pré-imune; (C) Maceração da PtSRP e (D) Imunização da PtSRP..... **126**

Figura 3. *Western Blot* da avaliação do anticorpo anti-PtSRP em reconhecer a proteína PtSRP (sangria total do coelho 18). Legenda: (M) Marcador molecular Precision Plus DNA Ladder Bio-rad; (1) 100ng da PtSRP; (2) 50ng da PtSRP; (3) 25ng da PtSRP; (4) 12.5ng da PtSRP; (5) 6.25ng da PtSRP; (6) BI-21 não transformada; (7) BI-21 com pET21D fechado. A diluição do anticorpo foi de 1:2.000. As amostras foram fracionadas por eletroforese em gel 15% de poliacrilamida e transferidas para uma membrana de nitrocelulose e depois foi revelado por *western blot*..... **130**

Figura 4. *Western Blot* da avaliação do anticorpo anti-PtSRP em reconhecer a proteína PtSRP (sangria total do coelho 19). Legenda: (M) Marcador molecular Precision Plus DNA Ladder Bio-rad; (1) 100ng da PtSRP; (2) 50ng da PtSRP; (3) 25ng da PtSRP; (4) 12.5ng da PtSRP; (5) 6.25ng da PtSRP; (6) BI-21 não transformada; (7) BI-21 com pET21D fechado. A diluição do anticorpo foi de 1:2.000. As amostras foram fracionadas por eletroforese em gel 15% de poliacrilamida e transferidas para uma membrana de nitrocelulose e depois foi revelado por *western blot*..... **131**

Figura 5. *Western Blot* da avaliação do anticorpo anti-PtSRP em reconhecer a proteína PtSRP (sangria total do coelho 20). Legenda: (M) Marcador molecular Precision Plus DNA Ladder Bio-rad; (1) 100ng da PtSRP; (2) 50ng da PtSRP; (3) 25ng da PtSRP; (4) 12.5ng da PtSRP; (5) 6.25ng da PtSRP; (6) BI-21 não transformada; (7) BI-21 com pET21D fechado. A diluição do anticorpo foi de 1:2.000. As amostras foram fracionadas por eletroforese em gel 15% de poliacrilamida e transferidas para uma membrana de nitrocelulose e depois foi revelado por *western blot*..... **131**

Figura 6. *Western blot* da avaliação do anticorpo anti-PtSRP em reconhecer a proteína PtSRP (sangria total do coelho 21). Legenda: (M) Marcador molecular Precision Plus DNA Ladder Bio-rad; (1) 100ng da PtSRP; (2) 50ng da PtSRP; (3) 25ng da PtSRP; (4) 12.5ng da PtSRP; (5) 6.25ng da PtSRP; (6) BI-21 não transformada; (7) BI-21 com pET21D fechado. A diluição do anticorpo foi de 1:2.000. As amostras foram fracionadas por eletroforese em gel 15% de poliacrilamida e transferidas para uma membrana de nitrocelulose e depois foi revelado por *western blot*..... **132**

Figura 7. Imunolocalização da PtSRP por fluorescência no fungo *Pisolithus tinctorius*. (A) controle negativo; (B) Plano focal geral do micélio (Aumento); (C) Ampliação da imagem onde são observadas marcações pontuais da PtSRP na região periférica da hifa

(indicadas por setas); (D) detalhe da marcação da PtSRP na região correspondente a membrana/parede celular (setas)..... **133**

Figura 8. Imunolocalização da PtSRP no fungo *Pisolithus tinctorius* por microscopia confocal de fluorescência. (A e B) controle negativo; (C e D) Plano focal geral do micélio com marcação da PtSRP em toda extensão da hifa inclusive no grampo de conexão (setas brancas); (E e F) Imagens sobrepostas nas quais são observadas marcações da PtSRP ao longo de todo o micélio com maior acúmulo nas regiões da periferia da hifa, na região correspondente a membrana/parede celular (setas pretas)..... **134**

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

Tabela 1. Reação de ligação do <i>PtSRP</i> ao vetor pET21D(+)	90
Tabela 2. Reação de transformação da células DH10B com vetor pET21D(+)	91
Tabela 3. Reação de transformação de célula Bl-21 Star com o vetor pET21D(+)	92

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	24
2. OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivos gerais.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
CAPÍTULO I	27
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	27
3.1 AS MICORRIZAS.....	27
3.2 AS ECTOMICORRIZAS.....	28
3.2.1 Aspectos gerais.....	28
3.2.2 Fisiologia e nutrição das ectomicorrizas.....	33
3.2.3 Ocorrência das EM e especificidade.....	34
3.3 IMPORTÂNCIA DAS ECTOMICORRIZAS.....	37
3.4 FORMAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DAS ECTOMICORRIZAS.....	39
3.5 FATORES QUE INFLUENCIAM AS ECTOMICORRIZAS.....	43
3.6 ASPECTOS MOLECULARES DA ECTOMICORRIZAÇÃO/ GENES E PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA SIMBIOSE.....	44
REFERÊNCIAS.....	51
CAPÍTULO II.....	66
4. The full length <i>PtSRP</i> (<i>Pisolithus tinctorius</i> symbiosis related protein) fungal mRNA encodes a potential marker of ectomycorrhiza formation.....	66

CAPÍTULO III.....	74
5. CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA PtSRP DO FUNGO ECTOMICORRÍZICO <i>Pisolithus tinctorius</i>.....	74
1. INTRODUÇÃO.....	76
2. OBJETIVOS.....	78
2.1 Objetivo geral.....	78
2.2 Objetivos específicos.....	78
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	79
3.1. Material biológico e produção de biomassa para a expressão da PtSRP	79
3.2. Extração de RNA total do fungo ectomicorrízico <i>Pisolithus tinctorius</i>	79
3.3. Análise qualitativa e quantificação do RNA.....	80
3.4. Síntese de cDNA e confirmação do gene <i>PtSRP</i> do fungo ectomicorrízico <i>Pisolithus tinctorius</i>.....	81
3.5. Desenho de iniciadores para a amplificação do mRNA do <i>PtSRP</i> via PCR	81
3.6. PCR de amplificação do <i>PtSRP</i> completo via PCR.....	82
3.7. Clonagem do amplicon de 604pb correspondente ao mRNA do gene <i>PtSRP</i>.....	82
3.8. Confirmação da clonagem do fragmento de 604pb e sequenciamento dos clones positivos	83
3.9. Edição e alinhamento da sequencia obtida via PCR com a construída via RACE 5'	83
3.10. Tradução <i>in silico</i> e comparação da ORF do gene <i>PtSRP</i> via RACE 5' com o fragmento obtido por PCR.....	84
3.11. Desenho de iniciadores com sítios de restrição (enzimas EcoR1 e Xho1) para a amplificação da ORF do <i>PtSRP</i>.....	84
3.12. PCR de amplificação da ORF do Gene <i>PtSRP</i> completo com sítios de restrição (enzimas EcoR1 e Xho1).....	85

3.13. Clonagem da ORF do Gene <i>PtSRP</i> completo com sítios de restrição EcoR1 e Xho1, em vetor pJET1.2 Fermentas®.....	85
3.14. PCR de confirmação da clonagem em vetor pJET 1.2 – Fermentas® e miniprep.....	86
3.15. Extrações do DNA plasmidial dos clones positivos.....	87
3.16. Sequenciamento dos clones positivos de 1-10.....	87
3.17. Digestão dupla dos clones positivos para a retirada do inserto e subclonagem em vetor de expressão pET21D(+)......	88
3.18. Purificação do inserto de 401pb a partir do gel de agarose.....	88
3.19. Digestão do vetor pET21D(+) com as enzimas EcoR1 e Xho1.....	89
3.20. Ligação do <i>PtSRP</i> ao Vetor pET21D(+) e transformação em células quimiocompetentes DH10B.....	90
3.21. PCR colônia para confirmação da Clonagem e transformação em DH10B.....	91
3.22. Transformação em célula quimiocompetente BI-21 Star.....	91
3.23. Mini-indução de síntese proteica da <i>PtSRP</i> em <i>E. coli</i>	92
3.24. <i>Western blot</i> e detecção da <i>PtSRP</i> por quimioluminescência.....	93
3.25. Expressão em larga escala da <i>PtSRP</i> em <i>E. coli</i>	94
3.26. Purificação da <i>PtSRP</i> em condição nativa.....	95
3.27. Diálise da <i>PtSRP</i> purificada em condição nativa.....	96
3.28. Quantificação através da Curva de BSA da <i>PtSRP</i> purificada em condição nativa.....	96
3.29. Indução em larga escala e purificação da <i>PtSRP</i> sob condição desnaturante.....	97
4. RESULTADOS.....	98
4.1. Material biológico e produção de biomassa para a expressão da <i>PtSRP</i>	98
4.2. Síntese de cDNA e confirmação do Gene <i>PtSRP</i> do fungo ectomicorrízico <i>Pisolithus tinctorius</i>	98
4.3. PCR de amplificação do <i>PtSRP</i> completo.....	99

4.4. Edição e alinhamento da sequencia obtida por PCR, com a via RACE 5'.....	100
4.5. Tradução <i>in silico</i> e comparação da ORF do gene <i>PtSRP</i> via RACE 5' com a obtida por PCR.....	101
4.6. PCR da ORF do gene <i>PtSRP</i> com sítios de restrição <i>EcoR1/Xho1</i> e clonagem em vetor pJET 1.2 – Fermentas®.....	102
4.7. Clonagem da ORF do gene <i>PtSRP</i> em vetor de expressão pET21D(+)......	104
4.8. Expressão em pequena escala da <i>PtSRP</i> em <i>E. coli</i>	106
4.9. Detecção da <i>PtSRP</i> por <i>Western blot</i>	107
4.10. Purificação da <i>PtSRP</i> em condição nativa.....	108
4.11. Expressão em larga escala da <i>PtSRP</i> e sua purificação sob condição desnaturante.....	109
5. DISCUSSÃO.....	111
6. CONCLUSÕES.....	114
REFERÊNCIAS.....	115
CAPÍTULO IV.....	119
6. IMUNOLocalização da <i>PtSRP</i> NO FUNGO Ectomicorrízico <i>Pisolithus tinctorius</i>	119
1. INTRODUÇÃO.....	121
2. OBJETIVOS.....	123
2.1 Objetivos gerais.....	123
2.2 Objetivos específicos.....	123
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	124
3.1 Microcultivo em lâmina do isolado ectomicorrízico <i>Pisolithus tinctorius</i> (Pt-103).....	124

3.2 Expressão e purificação da PtSRP.....	125
3.3 Produção de anticorpos policlonais anti-PtSRP com a PtSRP desnaturada e nativa.....	125
3.4 Detecção da proteína PtSRP por imunofluorescência e confocal.....	128
4. RESULTADOS.....	130
4.1 Imunização de coelhos e avaliação da produção de anticorpos específicos contra a PtSRP por <i>Western blot</i>.....	130
4.2 Imunolocalização da PtSRP no fungo <i>Pisolithus tinctorius</i> através da microscopia de fluorescência.....	133
4.3 Imunolocalização da PtSRP no fungo <i>Pisolithus tinctorius</i> através da microscopia confocal de fluorescência.....	134
5. DISCUSSÃO.....	136
6. CONCLUSÕES.....	139
REFERÊNCIAS.....	140
7. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS.....	143

1. INTRODUÇÃO

As ectomicorrizas são um tipo de micorriza no qual o fungo se desenvolve externamente à raiz e nos espaços intercelulares do córtex da planta hospedeira estabelecendo uma relação simbiótica mutualística em que ambos os envolvidos são beneficiados: o fungo recebe carboidratos fotossintetizados e em troca fornece água e nutrientes pouco móveis do solo (SOUZA et al., 2006; SMITH & READ, 2008; BÜCKING et al., 2012).

Estima-se que este tipo de associação ocorra em 90% das árvores em regiões de clima temperado e em países de clima tropical, como o Brasil, ectomicorrizas já foram descritas em diversas famílias botânicas como Pinaceae (*Pinus* spp.) e Myrtaceae (*Eucalyptus* spp.) com registros predominantes, no sul do país (especialmente em Santa Catarina) e no sudeste de Minas Gerais (CARDOSO et al., 1992). O Brasil se destaca como o país que apresenta o maior programa de reflorestamento do mundo (LIMA, 1993; SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, 1994), com as espécies dos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus* sendo as mais utilizadas (GIACHINI et al., 2000, 2004; ENGEL & PARROTTA, 2001).

Devido ao valor econômico das ectomicorrizas, estudos em diversas áreas como bioquímica, genética e biologia molecular têm sido feitos a fim de melhor compreender o mecanismo de simbiose (MENOTTA et al., 2004; LE QUÉRÉ et al., 2005; MARTIN et al., 2008; DUPLESSIS et al., 2005; ACIOLI-SANTOS et al., 2008, 2010; VIEIRA et al., 2012).

O reconhecimento entre o micobionte e o hospedeiro promove a expressão diferenciada de genes, com a ativação de algumas enzimas e síntese de proteínas fundamentais nos estádios iniciais do desenvolvimento da micorriza (BARKER et al., 1998; BONFANTE-FASOLO & SPANU, 1994; ACIOLI-SANTOS et al., 2010). Dentre as proteínas descritas como potenciais participantes da simbiose estão as ectomicorrizinas (HILBERT et al., 1991), as hidrofobinas (TAGU et al., 2001; DUPLESSIS et al., 2005; LE QUÉRÉ et al., 2004; ACIOLI-SANTOS et al., 2008) e as SRAPs (symbiosis related acid protein) (LAURENT et al., 1999). Estas últimas consideradas fortes marcadoras do desenvolvimento da associação ectomicorrízica entre *Pisolithus tinctorius* e *Eucalyptus globulus* (DUPLESSIS et al., 2005).

Através de técnicas como os macroarranjos de cDNA, no sistema *P. tinctorius* - *Castanea sativa*, Acioli- Santos et al. (2008) identificaram a participação de diversos genes fúngicos de função desconhecida. Um deles (Clone ID: 1440), o gene batizado de *PtSRR1* – *Pisolithus tinctorius symbiosis related receptor 1* (Hoje chamado de PtSRP), por apresentar uma expressão positiva entre 6-12h quando em indução micorrízica, teve sua porção 3' parcialmente caracterizada (ACIOLI-SANTOS et al., 2009). Os dados revelaram a possibilidade de este gene estar envolvido no processo de reconhecimento fungo X planta dada a forte possibilidade de ser esta uma proteína transmembranar. Embora houvesse indícios de que este gene estaria relacionado à ectomicorrização, não foi encontrado para o peptídeo traduzido nenhum domínio conservado clássico de proteínas previamente caracterizadas nem de estrutura cristalizada similar em bancos de dados (ACIOLI-SANTOS et al., 2009).

Mais recentemente foi obtida a porção 5' restante da ORF para o gene *PtSRP*, através de uma técnica que permite o isolamento de mRNAs completos denominada RACE 5' (Rapid amplification of cDNA ends). Esta nova porção juntamente com a sequência 3' parcial do *PtSRR1* depositada no NCBI (Access. No. EL563703) deu origem a um novo fragmento de 636 pb, compreendendo uma ORF mais provável (coincide com uma ORF encontrada em estudos anteriores para o fragmento parcial do mesmo gene de 384 pb. Análises preliminares apontaram para um peptídeo de peso molecular de 13,969 kDa com um potencial isoelétrico de 3.92, reforçando análises anteriores de que esta proteína fosse transmembranar (VIEIRA et al., 2012).

No presente estudo, nossos objetivos foram o aprofundamento das análises bioinformacionais desta construção, de modo a antever o papel da PtSRP na simbiose. No capítulo I é apresentada a revisão da literatura relacionada ao tema. No capítulo II apresenta-se um artigo sobre a predição da proteína putativa e sua provável função na associação. A clonagem, expressão e purificação da Proteína PtSRP é descrita no capítulo III e no IV e último capítulo são apresentados os resultados da imunolocalização da PtSRP no fungo ectomicorrizico *Pisolithus tinctorius* com vistas da elucidação parcial do papel fisiológico no desenvolvimento da simbiose.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Editar, clonar e expressar o peptídeo do gene *PtSRP* para obtenção da proteína recombinante PtSRP em sistema de expressão e identificar a PtSRP *in vivo* através de imunomarcação por fluorescência.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a edição do gene *PtSRP* através de programas informacionais;
- Realizar a clonagem e expressão do gene *PtSRP* em bactérias;
- Purificar a proteína codificada pelo gene *PtSRP*;
- Realizar imunização em coelhos para produção de anticorpos específicos;
- Localizar a proteína PtSRP por imunofluorescência nas células do fungo *P. tinctorius*;
- Relacionar os dados da imunolocalização celular da PtSRP ao advento da ectomicorrização, dando ênfase à sua provável função na célula.

CAPÍTULO I

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 AS MICORRIZAS

As micorrizas constituem um sistema complexo formado por fungos e plantas, no qual, parte do genoma de ambos é ativada sob a influência do ambiente, na regência da simbiose (SMITH & READ, 2008). O termo “micorriza” foi inicialmente empregado em 1885, pelo botânico alemão Albert Bernard Frank, para a descrição de um “órgão independente” formado pela associação entre o micélio e as raízes de plantas (FRANK, 1885). O mesmo autor, em 1894, também especulou sobre a retenção da habilidade saprofítica ancestral de alguns basidiomicetos ectomicorrízicos, além de demonstrar que o micélio abundante na rizosfera ajudava a absorver nutrientes do solo sem causar danos à planta hospedeira (FRANK, 1894).

Smith & Read (2008) sugerem a existência de sete tipos de micorrizas, com base em características tais como tipo de hifas, padrão de colonização da raiz, presença da rede de Hartig, táxon do fungo e táxon da planta (Briófita, Pteridófitas, Gimnospermas e Angiospermas). Os sete tipos são: arbuscular, ectomicorriza, ectendomicorriza, arbutóide, monotrópide, ericóide e orquídeide, sendo as micorrizas arbusculares e as ectomicorrizas as mais comumente encontradas (BELLEI & CARVALHO, 1992; MOYERSON et al., 2001; TRESEDER & CROSS, 2006; BRUNDRETT, 2009; TEDERSOO et al., 2010).

Acredita-se que as micorrizas tenham surgido há cerca de 400 milhões de anos, a partir de uma condição micorrízica arbuscular ancestral, quando a vida vegetal do planeta dava os primeiros passos rumo ao ambiente terrestre (CAIRNEY, 2000; BRUNDRETT, 2002). Segundo Schüßler et al. (2001), existem quatro hipóteses para explicar o surgimento e a formação das micorrizas ao longo do tempo. A primeira propõe que a co-evolução de plantas e fungos micorrízicos arbusculares (FMA) teria se iniciado em ambiente aquático. A segunda hipótese afirma que a associação teria ocorrido após a entrada das plantas no ambiente terrestre. A terceira sugere que, antes mesmo de existirem os FMA, outros fungos de hábito parasita ou saprófito seriam os

responsáveis pelo surgimento da simbiose após o estabelecimento das plantas na terra. Por fim, a quarta hipótese diz que a interação “fungos – plantas colonizadoras do ambiente terrestre” teria se tornado mais complexa com o passar dos anos, a partir de simbioses mais primitivas pré-existentes.

De modo geral, a micorriza funcional oferece aos simbioses uma série de benefícios. O fungo estabelece associação mutualística com as raízes das plantas vasculares (SMITH & READ, 2008) e, ao colonizar o sistema radicular, se ramifica pelo solo ampliando a área de absorção de nutrientes essenciais à planta como o fósforo, zinco, manganês e cobre, entre outros. Em contrapartida, o fungo se beneficia recebendo carboidratos fotossintetizados pela planta (EZAWA et al., 2002; BAGO et al., 2002; CHALOT et al., 2002; SOUZA et al., 2006). Adicionalmente, a planta passa a responder melhor a variações bruscas de pH do solo (MARSCHNER, 1991; CULLINGS & MAKHIJA, 2001), apresenta maior tolerância a compostos tóxicos de difícil metabolização como os metais pesados (BRUNNER & FREY, 2000; CHRISTIE et al., 2004; ALEXANDRE et al., 2012), além de estar mais protegida contra o ataque de possíveis agentes fitopatogênicos (MARX, 1972; DUCHESNE et al., 1988; CORDIER et al., 1998). O fungo por sua vez também se beneficia, pois encontra na planta um compartimento interno de proteção, o que lhe traz vantagens adaptativas além de receber carboidratos fotossintetizados. Sendo assim, essa interação simbiótica mutualista é importante na determinação do modo como as plantas e os fungos sobrevivem e se adaptam ao tempo/ambiente, em condições adversas (SELOSSE et al., 2004; SMITH & READ, 2008).

3.2 AS ECTOMICORRIZAS

3.2.1 Aspectos gerais

As ectomicorrizas (do grego, ektos = externo; mykes=fungo; rhiza=raiz) são um tipo particular de micorriza na qual o fungo coloniza externamente as raízes e os espaços intercelulares do córtex da planta. Neste tipo de associação, não há formação de estruturas (como as vesículas e os arbúsculos das micorrizas arbusculares) no interior das células do hospedeiro, sendo possível distinguir uma raiz colonizada pelas características específicas dessa associação (SMITH & READ, 2008), com grande

diversidade de padrões de ramificação lateral das raízes de plantas colonizadas com diferentes fungos ectomicorrízicos (**Figura 1**).

Um dos primeiros registros fósseis do aparecimento das ectomicorrizas data de 50 Ma (Eoceno) e, embora não seja possível indicar a data precisa de sua origem, acredita-se que a associação tenha aparecido bem antes, a 200 Ma, juntamente com o surgimento dos basidiomicetos ressupinados (CAIRNEY, 2000).

Embora haja variações nas características morfológicas/estruturais, em geral as ectomicorrizas apresentam três estruturas principais: a rede de Hartig, o manto e o micélio externo/circundante (**Figura 2**).

A rede de Hartig é um composto de hifas originárias a partir do manto interior que na maioria das espécies angiospérmicas, desenvolve-se apenas em torno das células epidérmicas da raiz, formando uma interface de troca de nutrientes complexas enquanto que nas coníferas ela se forma em torno de ambas: células epidérmicas e corticais (**Figura 2.A**) (PETERSON et al., 2004).

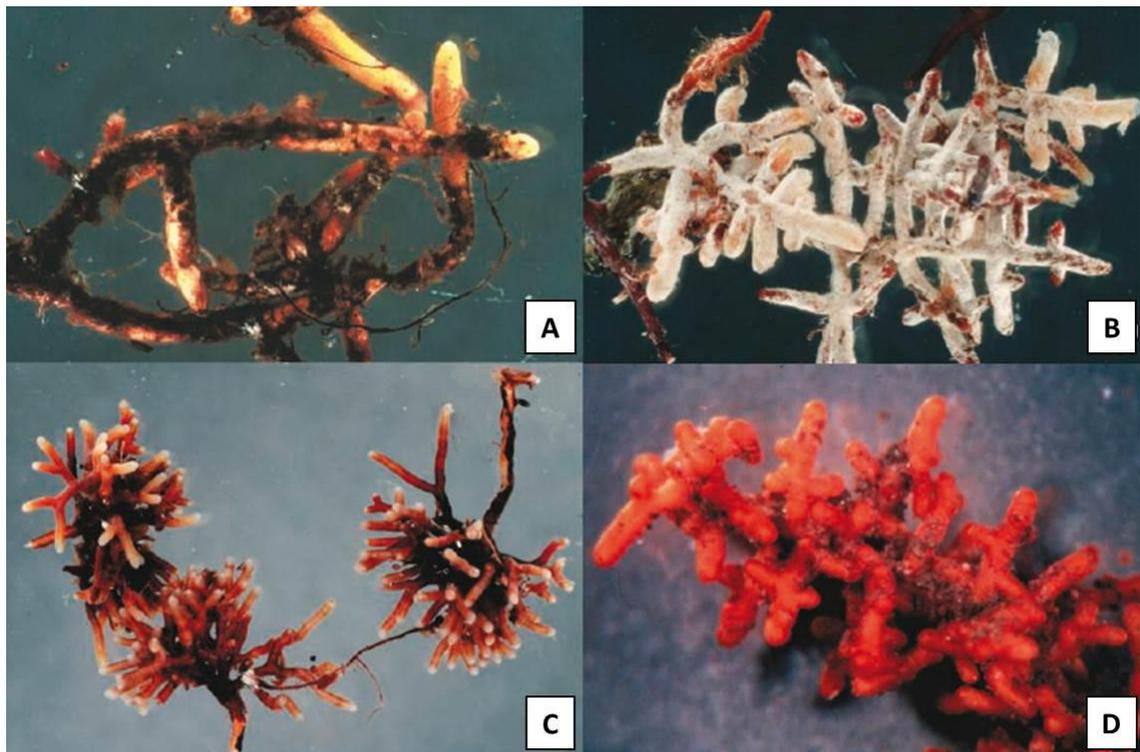


Figura 1. Diversidade do padrão de ramificação lateral de raízes de plantas colonizadas por diferentes fungos ectomicorrízicos. **A.** Ramificação do tipo monopodial-pinada da ectomicorriza formada por *Truncocolumella citrina-Pseudotsuga menziesii*. **B.** Um denso agrupamento das raízes (monopodial-pinada e monopodial-piramidal) da ectomicorriza de *Rhizopogon flavofibrillosus-Pseudotsuga menziesii*. **C.** Um sistema múltiplo de raízes dicotômicas na ectomicorriza formada entre *Thelephora terrestris-Pinus ponderosa*. **D.** Denso agrupamento de raízes de *Fagus grandifolia* associadas com espécies de fungos desconhecidos (PETERSON et al., 2004).

Durante a fase inicial de formação da rede de Hartig, a penetração das hifas se dá através de processos mecânicos ou pela ação de enzimas hidrolíticas capazes de degradar as paredes celulares das células corticais do hospedeiro, sem atingir a região endodérmica (MARTIN et al., 2008; SMITH & READ, 2008; BÜCKING et al., 2012). A principal função das hifas é realizar a troca de nutrientes (TAGU et al., 2002a), como a maioria dos açúcares, absorvidos através das hifas (CHEN & HAMPP, 1993; MARSCHNER & DELL, 1994; BÜCKING & HEYSER 2001), passando minerais como os fosfatos e água para as células da raiz (MARSCHNER & DELL, 1994; BÜCKING & HEYSER 2001, SMITH & READ, 2008). No citoplasma das hifas da rede de Hartig que ficam adjacentes às células corticais foi constatada a presença de vários núcleos, retículos endoplasmáticos e mitocôndrias polimórficas indicando uma intensa atividade celular, característica de uma simbiose funcional ativa (GROSS et al., 2004).

A segunda estrutura típica das ectomicorrizas, o manto (**Figura 2.A e Figura 2.B**) é formado por uma massa de hifas que recobre externamente a raiz hospedeira, podendo variar quanto ao modo organizacional, cor e espessura, de acordo com os simbiontes envolvidos (BELLEI & CARVALHO, 1992; SMITH & READ, 2008; BÜCKING et al., 2012). Embora seja a rede de Hartig a principal estrutura ectomicorrízica responsável por realizar as trocas metabólicas, há indícios de que o manto apresente uma permeabilidade diferencial, com a transferência radial de íons e bloqueio da perda de açúcares e de moléculas orgânicas de tamanho similares (VESK et al., 2000). Exemplo dessa estrutura pode ser observado na ectomicorriza de *Pisolithus tinctorius* - *Pinus pumila* em corte transversal (**Figura 2.B**) (COSTA et al., 2002).

Essa permeabilidade seletiva pode estar relacionada às inúmeras ramificações das hifas no manto interno, atuando no movimento bi-direcional de nutrientes. Dessa forma, o fungo é capaz de absorver a glucose e/ou frutose a partir de células de raízes e convertê-los em hidratos de carbono, trealose e manitol, ou no glicogênio além da absorção e transferências de outros compostos, incluindo lipídios, proteínas, compostos fenólicos e de polifosfatos (PETERSON et al., 2004). Também a hifa pode se organizar de tal maneira a formar um falso tecido parenquimatoso e isso pode ter influência direta na maneira como a água e outros nutrientes são absorvidos (PETERSON & BONFANTE, 1994; SMITH & READ, 2008). Além de todos esses benefícios já foi relatada a importância do manto na proteção das plantas contra patógenos de raiz (PETERSON et al., 2004; SMITH & READ, 2008).

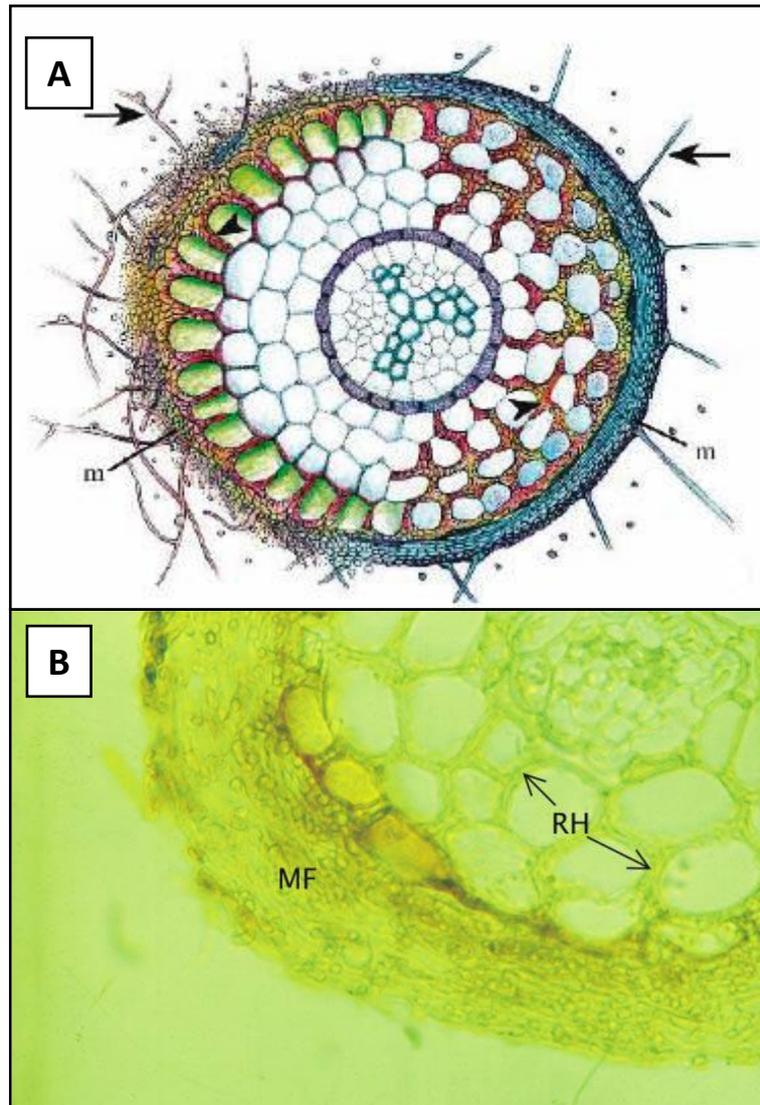


Figura 2. A. Diagrama de ectomicorriza em corte transversal ilustrando as características das Angiospermas (porção da esquerda) e coníferas (porção direita). Ambos apresentam o manto (m), Rede de Hartig (setas curtas), micélio externo (setas longas). A principal diferença entre esses dois sistemas é que a Rede de Hartig nas Angiospermas é restrita às células epidérmicas enquanto nas coníferas ela se forma em torno de ambas: células epidérmicas e corticais (PETERSON et al., 2004). B. Ectomicorriza de *Pisolithus tinctorius* - *Pinus pumila* em corte transversal. Legenda: (MF) manto fúngico, (RH) rede de Hartig nos espaços intercelulares do córtex (COSTA et al., 2002).

Por fim, tem-se o micélio externo que se desenvolve a partir das hifas que compõem o manto exterior e faz a ligação entre a ectomicorriza e o solo (ANDERSON & CAIRNEY, 2007; SMITH & READ, 2008). O micélio externo permite ao hospedeiro maior nutrição e captação de água (AUGÉ, 2001; MARJANOVIĆ & NEHLS, 2008) com aumento da região explorada pelas hifas ou rizomorfos no solo (BÜCKING et al., 2012), se comparada ao sistema de raízes de uma planta não micorrizada (THOMSON

et al., 1994; MARJANOVIĆ & NEHLS, 2008). O alcance do micélio externo pôde ser comprovado em estudos *in situ*, onde o fungo foi encontrado além da rizosfera de plantas cultivadas em câmaras de acrílico contendo solos de campo ou de outros substratos (**Figura 3A**). Em ectomicorriza de *Pisolithus tinctorius* associado a *Pinus strobus* a rede micelial se diferencia dando origem a rizomorfos (**Figura 3B**). Outro exemplo são as ectomicorrizas formadas pelos representantes do gênero *Cenococcum*. Neste caso, para que se inicie o desenvolvimento do micélio externo, certo número de camadas de hifas são necessárias no manto (**Figura 3C**) (PETERSON et al., 2004).

Além da importância na captação de água, o micélio externo pode proporcionar maior troca de nutrientes orgânicos e inorgânicos entre os organismos, sendo por isso uma estrutura de extrema importância (MARJANOVIĆ & NEHLS, 2008; SMITH & READ, 2008; BÜCKING et al., 2012).

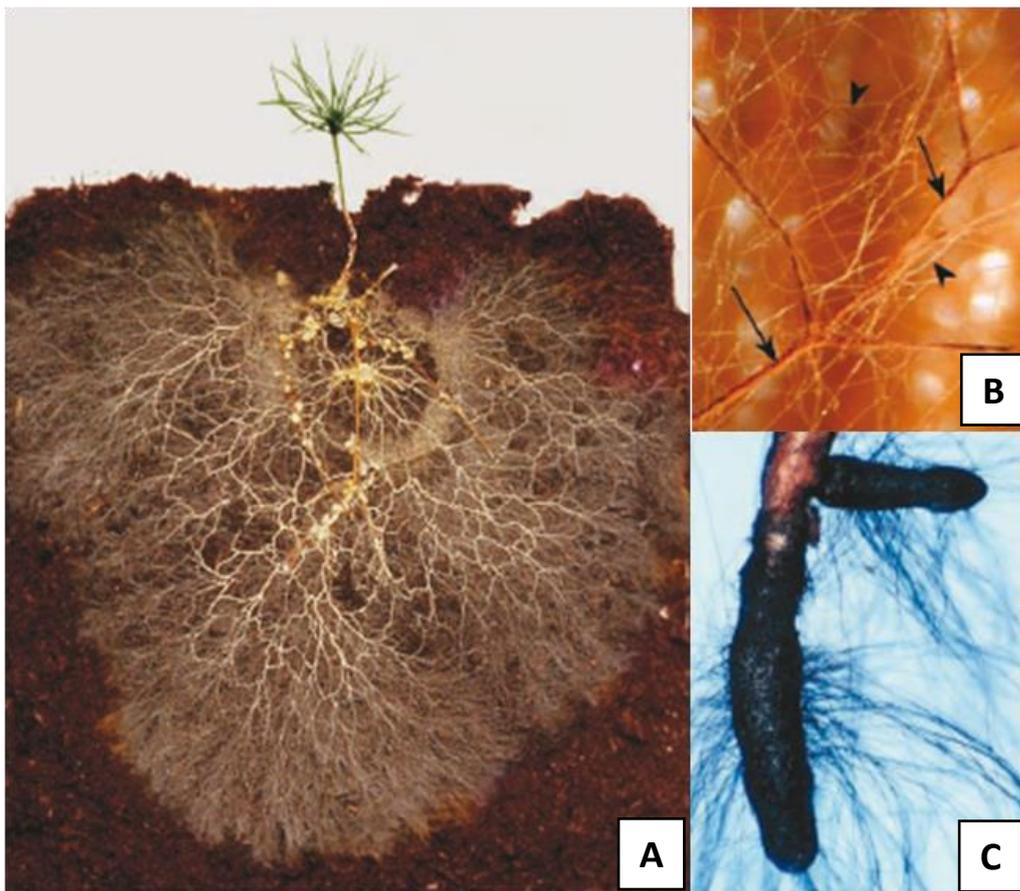


Figura 3. Micélio extraradical em diferentes ectomicorrizas. **A.** *Suillus bovinus* em associação com *Pinus sylvestris*. **B.** Micélio externo de *Pisolithus tinctorius* associado com *Pinus strobus* onde são observadas hifas de absorção mais delgadas (setas curtas) além de rizomorfos (setas longas). **C.** Fungo do gênero *Cenococcum* em associação com *Abies lasiocarpa* emanando um extenso micélio extraradical. (PETERSON et al., 2004).

3.2.2 Fisiologia e nutrição das ectomicorrizas

Em condições gerais, a associação ectomicorrízica resulta em boas taxas de crescimento para os vegetais, fazendo com que se desenvolvam melhor e mais adaptados as condições do ambiente (GIACHINI et al., 2000, 2004; ENGEL & PARROTTA, 2001). Os efeitos positivos que a associação micorrízica traz para as plantas encontram-se amplamente documentados (MARX et al., 1991; MARTINS et al., 1996; ARTURSSON et al., 2006; MELLO et al., 2006). Costa et al. (2002), por exemplo, demonstraram que mudas de *Eucalyptus grandis* inoculadas com *Pisolithus* spp. apresentaram maiores taxas de crescimento em comparação com o controle. A pesquisa também revelou que a taxa de crescimento das plantas variou de acordo com os micobiontes testados (**Figura 4**).

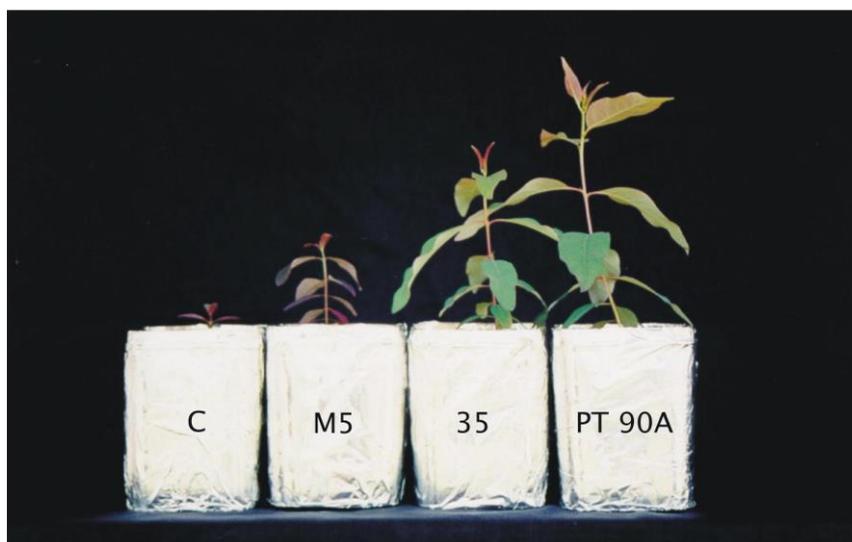


Figura 4. Crescimento de *Eucalyptus grandis* inoculado com diferentes isolados de *Pisolithus* spp. (M5, 35, PT 90A). C = controle, sem inoculação (COSTA et al., 2002).

Esses dados podem ter suporte no fato de que as espécies vegetais, quando ectomicorrizadas, utilizam de maneira mais eficiente certos nutrientes presentes no solo. Embora isso não seja uma regra, dadas as condições de disponibilidade desses nutrientes e o tipo de substrato a que estão submetidas, há menor acúmulo de cátions (K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} e Na^+) e maior de ânions (SO_4^{-2} , NO_3^- , Cl^- e PO_4^{-3}) nos tecidos do hospedeiro (BLEDSOE & RYGIEWICZ, 1986; MARSCHNER & DELL, 1994). Inicialmente, os nutrientes minerais são absorvidos pelo micélio externo e armazenados no manto. Em seguida, parte do nitrogênio e do fósforo que foi armazenado é convertida

em aminoácidos e polifosfatos e segue para a rede de Hartig, passando para as células do córtex da raiz, até atingir o xilema e as demais partes da planta (SIQUEIRA & FRANCO, 1988; PLASSARD et al., 2000; KOHZU et al., 2000; BÜCKING et al., 2007).

Sem dúvida, de todos os nutrientes citados, um é de extrema importância na vitalidade dos micobiontes: o fósforo. Este mineral possui alto valor energético e participa de diversos processos biológicos (nas formas de ATP e ADP) tais como: transporte ativo de moléculas, síntese e secreção de substâncias, divisão celular, entre outros (BERG et al., 2012). A presença desse composto foi demonstrada em mantos de ectomicorrizas processadas através de métodos de fixação convencional e de desidratação para microscopia de luz (ASHFORD et al., 1975), e microscopia eletrônica de transmissão (ASHFORD et al., 1986; STRULLU et al., 1982). No entanto, em estudos posteriores com ectomicorrizas de *P. tinctorius-Pinus sylvestris* foi visto que tais resultados poderiam ser interpretados como artefatos das técnicas de microscopia, no decorrer do processo (BÜCKING & HEYSER, 1999). De um modo geral, a absorção de P e de outros nutrientes é mais eficiente nas ectomicorrizas devido ao fato de esses fungos produzirem fosfatases (TIBBETT et al., 1998) e proteases (NEHLS et al., 2001). Essas enzimas têm a função de solubilizar estes componentes do solo tornando-os disponíveis para a planta (LAPEYRIE et al., 1991; LANDEWEERT et al., 2001) e contribuindo para a ciclagem desses elementos no ambiente.

3.2.3 Ocorrência das EM e especificidade

Apesar de ocorrerem em apenas 10 % das espécies vasculares, as ectomicorrizas são encontradas em 90% das árvores de clima temperado (WILCOX, 1990), predominando em plantas de interesse silvicultural, como as espécies de *Eucalyptus* e *Pinus* (OLIVEIRA et al., 2008).

A maioria das espécies de fungos capazes de formar ectomicorrizas (cerca de 6.000 espécies) pertence ao Filo Basidiomycota, com algumas espécies pertencentes aos Ascomycota e a um gênero de Zygomycota, *Endogone* (SMITH & READ, 2008; BÜCKING et al., 2012). Destes, cerca de 80% são epígeos, (**Figura 5**); algumas poucas hipógeas mantêm as suas estruturas reprodutivas no subsolo (PETERSON et al., 2004). É possível encontrar uma extensa lista com as espécies de fungos conhecidamente ectomicorrízicos em Molina et al. (1992) e Smith e Read (2008).

Dentre os fungos pertencentes ao Filo Basidiomycota, é nas famílias Amanitaceae, Boletaceae e Russulaceae que se encontra a maioria dos fungos ectomicorrízicos (HORTON & BRUNS, 2001; BRUNDRETT, 2002). Nestas e em outras famílias, as espécies micorrízicas de *Pisolithus* e *Scleroderma* (Sclerodermataceae), *Rhizopogon*, *Amanita*, *Lactarius*, *Russula*, *Thelephora* (Thelephoraceae) e *Ramaria* (Ramariaceae) colonizam, principalmente, árvores de *Pinus* e *Eucalyptus* (GIACHINI et al., 2000; 2004).

As ectomicorrizas são normalmente encontradas em espécies arbóreas, embora alguns arbustos e espécies herbáceas também possam desenvolver esta associação (SMITH & READ, 2008; ACIOLI-SANTOS et al., 2010). As espécies arbóreas são importantes comercialmente uma vez que são utilizadas pela indústria da madeira além de comercializadas como matéria prima no fabrico do papel e derivados (TURNBULL, 2000). Lista detalhada das famílias de coníferas e angiospermas que formam ectomicorrizas encontra-se em Smith & Read (2008).

Cerca de 35 famílias botânicas de Angiospérmas e Gimnospérmas são reconhecidamente ectomicorrízicas, em que pelo menos um indivíduo foi analisado e caracterizado como formador da simbiose (SMITH & READ, 2008). Das gimnospérmicas, os gêneros de coníferas *Picea*, *Pinus* e *Larix* formam vastas áreas da floresta boreal no hemisfério norte, enquanto outras espécies de coníferas, tais como *Pseudotsuga menziesii* e *Picea sitchensis* ocorrem nas florestas do noroeste da América do Norte (PETERSON et al., 2004). As Angiospermas ectomicorrízicas, incluindo *Alnus*, *Betula*, *Fagus* e *Quercus*, ocorrem de forma generalizada em florestas do Norte temperado de todo o mundo. No hemisfério sul, os gêneros *Pinus* e *Eucalyptus*, além de vários outros da família das Dipterocarpaceae são as espécies de árvores ectomicorrízicas dominantes, e por isso esses vegetais vêm sendo utilizados na construção de sistemas experimentais para estudos de fisiologia e bioquímica em ectomicorrizas, além de estarem entre as plantas mais exploradas em silvicultura (DUDDRIDGE & READ, 1984; LAPEYRIE et al., 1990; BARKER et al., 2002).



Figura 5. Exemplos de basidiomas epigeos, todos presumidamente ectomicorrizicos. **A.** *Amanita rubescens*; **B.** *Amanita muscaria* crescendo numa floresta mista de madeira de coníferas no sul de Quebec; **C.** *Amanita frostiana*; **D.** *Hygrophorus fuliginus*; **E.** *Russula* sp.; **F.** *Suillus grevillei*; **G.** Um representante do gênero *Leccinum*, crescendo nas proximidades de *Betula pendula*; **H.** Espécime de *Albatrellus* cf. *ovidus* crescendo sob coníferas nas montanhas rochosas canadenses; **I.** Espécime de *Cantharellus*, provável *tubaeformis*, crescendo sob um dossel, as montanhas rochosas canadenses (PETERSON et al., 2004).

Existe uma variação no que se refere à infectividade e eficiência das espécies fúngicas para a micorrização (ALVES et al., 2001; OLIVEIRA et al., 1994; GIACHINI

et al., 2000; 2004). Essa variação é explicada, em parte, pela especificidade entre o fungo e o hospedeiro sendo detectada como um fator determinante na simbiose. Nas ectomicorrizas, esta especificidade pode acontecer entre gêneros ou até mesmo espécies (MOLINA et al., 1992; OLIVEIRA et al., 1994; 2008; ACIOLI-SANTOS et al., 2010). Estudos têm sido feitos a fim de comprovar a sua eficiência através do desenvolvimento de sistemas de interação *in vitro* que buscam a obtenção de modelos experimentais. Em especial estão os sistemas que utilizam plantas de *Eucalyptus* e fungos do gênero *Pisolithus* (LEI et al., 1990; MARTIN et al., 2001; CAIRNEY, 2002; PETER et al., 2003).

Estudos de seleção de isolados de fungos ectomicorrízicos fazem-se necessários para identificar os simbioses compatíveis com determinada espécie vegetal e condições ambientais, tendo como finalidade o aumento da sobrevivência das mudas e, conseqüentemente, maior produtividade das plantações (GARBAYE, 1984; OLIVEIRA et al., 2008; ROSSI et al., 2002; ACIOLI-SANTOS et al., 2010).

3.3 IMPORTÂNCIA DAS ECTOMICORRIZAS

Pela natureza de simbiose mutualista as ectomicorrizas são de grande importância ecológica e econômica, sob vários aspectos (TURNBULL, 2000; BRUNNER, 2001; DAHLBERG, 2001), pois atuam diretamente na composição dos solos participando da ciclagem global de nutrientes (SMITH & READ, 2008). Os fungos ectomicorrízicos são comuns em solos ricos em matéria orgânica e, além de estabelecer a simbiose, podem transformar certas substâncias tornando-as disponíveis para as plantas (CAIRNEY, 2000).

Os fungos ectomicorrízicos conseguem mobilizar certos nutrientes essenciais às plantas diretamente de minerais através da excreção de ácidos orgânicos, afetando a ciclagem destes compostos em sistemas florestais (LANDEWEERT et al., 2001). Além disso, a micorriza pode aumentar a tolerância do vegetal quando este é submetido a solos de composição ácida ou com alta toxidez, ou ainda, elevar a viabilidade das árvores frente ao impacto da ação eutrofisadora em solos florestais (BRUNNER, 2001).

Metais nocivos podem ser ligados a polifosfatos e outros depósitos vacuolares no manto, impedindo a sua absorção pelas raízes. Este fato é relevante se pensarmos no

plantio de mudas arbóreas inoculadas com fungos ectomicorrízicos (PETERSON et al., 2004). A natureza compacta dos mantos de algumas ectomicorrizas podem contribuir para a proteção das raízes da perda de água, solos secos e contra a entrada de organismos patogênicos (SMITH & READ, 2008).

A interação entre espécies do gênero *Pisolithus* na formação de ectomicorrizas com *Eucalyptus* em que evidencia o potencial de reabilitação das plantas ectomicorrizadas em solos degradados, apontaram o fungo *Pisolithus tinctorius* como aquele que mais se adaptou à situação de reflorestamento em áreas sujeitas a estresse edáfico (CAIRNEY & CHAMBERS, 1997). No Brasil, espécies de *Pinus* e *Eucalyptus* são bastante utilizados em programas de reflorestamento (GIACHINI et al., 2000, 2004; ENGEL & PARROTTA, 2001). A introdução dessas plantas no país se deu no início do século XX, em decorrência da demanda de matérias primas como madeira (LIMA, 1993) e atualmente há mais de 4.6 milhões de ectáres plantados com espécies desses gêneros (GIACHINI et al., 2000). Segundo a Sociedade Brasileira de Silvicultura (1997), haveria um déficit mundial de madeira até o ano de 2010 e essa projeção faz crescer o interesse por novas tecnologias que propiciem aumento na produtividade dessa matéria prima.

O Brasil responde por 31% da produção de celulose de fibra de eucalipto, o equivalente a 22 milhões de toneladas por ano. Em 2010, estimaou-se a capacidade anual para a produção de celulose em 8,2 milhões de toneladas de um total global próximo a 27 milhões (MERCADANTE & CAPO, 2006 *apud* MAGATON et al., 2008).

Para além do mercado da madeira, não se pode esquecer que o basidioma de algumas espécies de fungos ectomicorrízicos é bastante apreciado pela indústria alimentícia devido ao seu alto valor de comercialização, como as espécies *Tuber melanosporum*, *Tuber magnatum*, *Tricholoma matsutake*, *Boletus edulis* e *Amanita caesarea* (YUN & HALL, 2004), com mercado mundial total mensurado em milhões de dólares (TURNBULL, 2000; HALL et al., 2003).

3.4 FORMAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DAS ECTOMICORRIZAS

Durante o processo de formação e desenvolvimento, os micobiontes passam por diversas modificações fisiológicas e anatômicas (LE QUÉRÉ et al., 2005). Acredita-se que muitas destas transformações sejam o resultado das interações ocorridas entre os simbiontes a partir da fase de pré-infecção, pela síntese de vários hormônios e outras substâncias (auxinas, citoquininas, giberelinas e vitaminas) (MILLER, 1971; CRAFT & MILLER, 1974; SLANKIS, 1974; BARROSO et al., 1986; GOGALA, 1991; BARKER & TAGU, 2000; LUDWIG-MÜLLER, 2000; NIEMI et al., 2002).

Para que a associação tenha o sucesso e a estabilidade funcional necessária, deverá haver uma comunicação entre o fungo e a planta (TAGU et al., 2002a) iniciada muito antes da formação das estruturas típicas (manto, rede de Hartig, etc), sendo a produção de moléculas sinalizadoras a primeira etapa de desenvolvimento. Sob a influência de tais moléculas, os propágulos do fungo são estimulados a germinar (LAGRANGE et al., 2001), tal como acontece com o hospedeiro vegetal sob o estímulo fúngico (DITENGOU et al., 2003). Esse desenvolvimento resulta de uma cascata de eventos perfeitamente sincronizados e da coordenação entre os genomas dos dois parceiros (MARTIN & HILBERT, 1991; MARTIN & TAGU, 1999), desencadeando o processo de ontogênese das ectomicorizas.

As hifas produzidas a partir da germinação de propágulos do solo, ou até mesmo do micélio de uma micorriza pré-existente, tocam a superfície das raízes laterais e podem interagir com os pêlos radiculares, a coifa da raiz, ou a superfície das células epidérmicas, penetrando no córtex radicular, onde crescem e se ramificam (CHILVERS, 1968; FEUGEY et al., 1999; PETERSON et al., 2004). Um exemplo da interação entre as hifas de *Pisolithus tinctorius* e os pêlos radiculares de *Picea mariana*, é mostrada na **Figura 6. A-D**. Neste caso, as hifas (**Figura 6. B**) vão colonizando a raiz externamente e se ramificando gradativamente (**Figura 6. C**) até formar o manto (**Figura 6. D**).

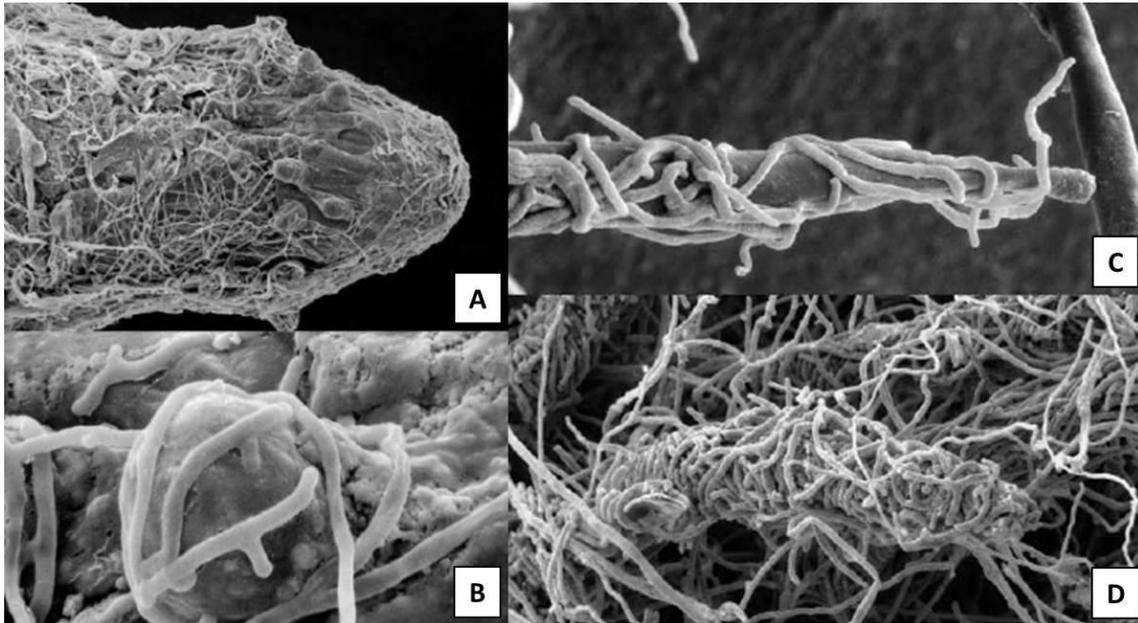


Figura 6. Sequência na colonização de pêlos radiculares de *Picea mariana* pelas hifas do fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*. As plantulas foram cultivadas em bolsas de crescimento e os sistemas radiculares inoculados com discos de ágar contendo micélio de *P. tinctorius*. As raízes colonizadas foram examinadas por microscopia eletrônica de varredura (PETERSON et al., 2004).

A germinação do propágulo fúngico pode ser influenciada pelas condições da rizosfera (zona de depleção para N e enriquecida para C), servindo de estímulo trófico para o crescimento da hifa em direção à raiz (TAGU et al., 2002a). Há relatos de que as adesinas formam uma densa rede fibrilar rica em glicoproteínas que preenche o espaço entre os parceiros, sendo secretada em forma de fibras orientadas juntamente com mucilagem polissacarídica, liderando o processo de contato entre o fungo e a planta. Este conjunto mais os receptores do hospedeiro são importantes para o contato entre os simbioses (MARTIN et al., 1999). Tal processo é semelhante às infecções fitopatogênicas. As hifas crescem, aumentam de volume e se ramificam aderindo à raiz da planta na presença ou ausência de pêlos radiculares (BARKER et al., 1998).

Momentos após o contato e aderência do fungo às células da epiderme do vegetal, ocorre a multiplicação das hifas em camadas para, após alguns dias, a formação da estrutura conhecida como manto (LE QUÉRÉ et al., 2005). Esta, por sua vez, poderá apresentar diferenças tanto na morfologia como na cor, extensão etc., variando de acordo com os organismos envolvidos na associação (SMITH & READ, 2008).

A planta também sofre a influência do fungo que a estimula a formar as raízes laterais (dicotomia), havendo a eliminação dos pêlos radiculares ou mudanças na estrutura do citoesqueleto (MARTIN et al., 2001). Para o vegetal, o citoesqueleto é importante na divisão celular, citocinese, formação da parede celular e alongação. No

fungo, o citoesqueleto tem participação na morfogênese e no crescimento das hifas (TIMONEN & PETERSON, 2002).

O desenvolvimento da ectomicorriza formada por *Paxillus involutus* e *Betula pendula* foi observado por Le Quéré et al. (2005). Esses autores documentaram com uma série temporal de fotografias em escalas macro e microscópica, as etapas de desenvolvimento e formação da simbiose. Tal processo vai desde o período inicial do fungo com as raízes hospedeiras, até o completo estabelecimento da rede de Hartig. Na **Figura 7**, a comparação das ilustrações macroscópicas (coluna à esquerda) com as microscópicas (coluna à direita) permite a confirmação de que essas plantas, após 21 dias de contato com o micobionte, já desenvolveram uma micorriza funcional, pelo menos do ponto de vista morfológico. Ao final do processo de diferenciação, com a formação das estruturas típicas (manto, rede de Hartig e micélio circundante), e havendo as trocas nutricionais entre os simbiosites, tem-se uma simbiose ativa e plenamente estabelecida (LE QUÉRÉ et al., 2005).

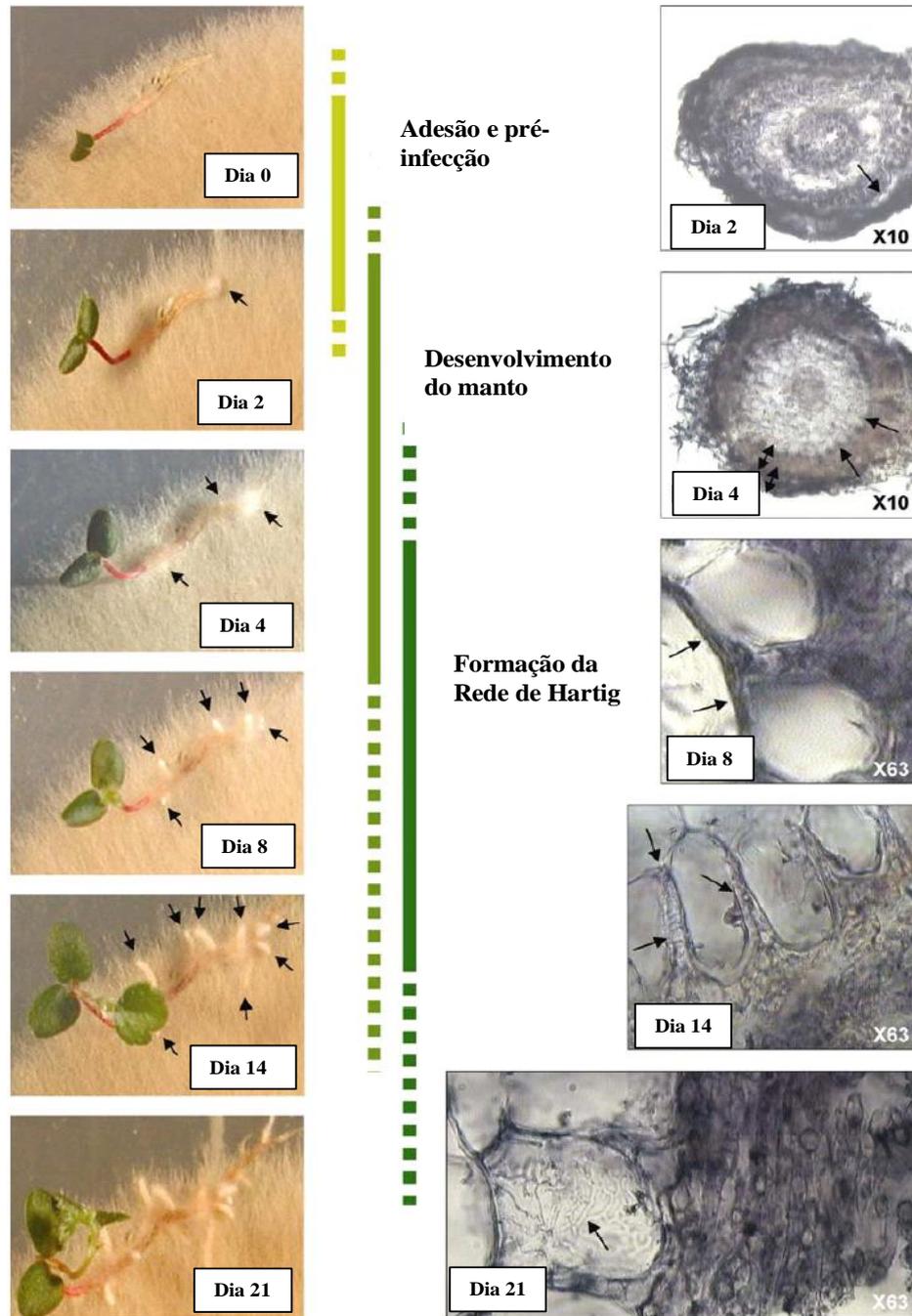


Figura 7. Estágios do desenvolvimento *in vitro* de ectomicorriza formada pela associação de *P. involutus* com *B. pendula*, entre 0 e 21 dias de interação. As setas à esquerda indicam as extremidades radiculares da plântula sendo cobertas pelo micélio, no início da formação do manto (0-4 dias) e surgimento de radículas laterais (4-21 dias). À direita, observam-se (4º dia) duas camadas do manto diferenciado (setas com duas cabeças) e penetração das hifas entre as células do córtex do hospedeiro (setas simples). Aos oito dias, observa-se o início da formação da rede de Hartig. Aos 14 dias, vê-se a rede de Hartig plenamente desenvolvida. Aos 21 dias, uma extensa ramificação do micélio nos espaços intercelulares do córtex radicular. (LE QUÉRÉ et al., 2005 adaptado de ACIOLI-SANTOS, 2006).

3.5 FATORES QUE INFLUENCIAM AS ECTOMICORRIZAS

O desenvolvimento da associação ectomicorrízica se inicia com alterações no metabolismo dos parceiros, culminado em modificações morfofisiológicas com a formação de compartimentos e estruturas específicas (PETERSON & BONFANTE, 1994; LE QUÉRÉ et al., 2005) que proporcionam a troca de nutrientes entre eles. Para que ocorra a colonização das raízes pela hifa é essencial que haja uma comunicação coordenada entre o fungo e a planta (MARTIN & TAGU, 1999; MARTIN et al., 2001).

Os exsudatos lançados na rizosfera exercem importante influência no desenvolvimento micorrízico, pois podem estimular a germinação dos esporos dos fungos ectomicorrízicos, além de afetar diretamente o solo e a microbiota (SMITH & READ, 2008).

No solo, macronutrientes como o P e o N são os que mais influenciam a colonização micorrízica. O P, se disponibilizado em grande quantidade, pode reduzir a colonização das raízes e diminuir a esporulação da micota presente. Em estudos com mudas de *Pinus* spp. bem nutridas com N e P, observou-se que a translocação de sacarose para as raízes era menor, limitando o crescimento dos fungos ectomicorrízicos (SIQUEIRA & FRANCO, 1988).

Outro fator que influencia o desenvolvimento das ectomicorrizas é a síntese de certos hormônios, tanto pelo vegetal como pelo fungo. Dentre os hormônios encontrados nas ectomicorrizas estão as auxinas, citoquininas e giberelinas (WULLSCHLEGERH & REID, 1990; BARKER & TAGU, 2000; DITENGOU & LAPEYRIE, 2000).

As auxinas podem ser encontradas, principalmente, nas gemas apicais e caules jovens das plantas, onde se mantêm os suprimentos nutricionais para as regiões de crescimento (RAVEN et al., 2007). Entre as substâncias denominadas auxinas, a mais comum é o ácido indol acético (AIA) que provoca o desenvolvimento do vegetal (TANG & LOO, 1940) através do alongamento e, conseqüentemente, o crescimento da planta (DITENGOU et al., 2003). No entanto, sabe-se que esse efeito pode variar dependendo do local de atuação e da concentração deste hormônio no vegetal (BARKER & TAGU, 2000; NIEMI et al., 2002). O papel dessas moléculas nas ectomicorrizas seria de modulação de algumas etapas do desenvolvimento da simbiose (GEA et al., 1994). Seu efeito no organismo poderia ser observado através da interação com substâncias reguladoras da planta e/ou do fungo como a hipaforina, hormônio que

se mostrou eficaz em neutralizar a atividade do AIA no alongamento do eucalipto, sem afetar a atividade de seus análogos (DITENGOU & LAPEYRIE, 2000). A atuação das auxinas vai além das modificações na anatomia das raízes; elas também estão envolvidas na conversão do amido em carboidratos importantes na fisiologia da simbiose ectomicorriza (BELLEI & CARVALHO, 1992).

Outro hormônio sintetizado por fungos ectomicorrízicos é a citoquinina (KRAIGHER et al., 1991; WULLSCHLEGERH & REID, 1990) e a sua função está relacionada com o retardamento do processo de maturação e suberização das raízes; o que proporciona à ectomicorriza uma maior sobrevivência e influencia a mobilização de nutrientes (NG et al., 1982; BARKER & TAGU, 2000).

Por fim, as giberelinas são encontradas nas plantas, principalmente nos tecidos jovens do sistema caulinar e sementes em desenvolvimento (RAVEN et al., 2007). Esses hormônios estimulam a divisão e o alongamento celular, fazendo com que a radícula rompa o tegumento da semente promovendo a sua germinação (TAIZ & ZEIGER, 2006). As giberelinas foram identificadas também em fungos ectomicorrízicos em cultura pura. Nas ectomicorrizas, giberelinas podem ser intercambiadas entre a planta hospedeira e o fungo (MILLER, 1971; CRAFT & MILLER, 1974; SLANKIS, 1974; BARROSO et al., 1986), embora sua verdadeira função na simbiose não esteja totalmente definida.

3.6 ASPECTOS MOLECULARES DA ECTOMICORRIZAÇÃO/ GENES E PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA SIMBIOSE

Embora os aspectos morfológicos das ectomicorrizas sejam reconhecidos e amplamente documentados na literatura científica, do ponto de vista da morfologia ectomicorrízica, os micorrizologistas buscam a compreensão dos eventos moleculares que levam à associação entre fungo e planta (MARTIN et al., 2008, 2010; ACIOLI-SANTOS et al., 2010; VIEIRA et al., 2012). Estes eventos começaram a ser estudados há pouco mais de duas décadas e, embora o conhecimento sobre o mecanismo de formação da simbiose não esteja completo, sabe-se que as etapas que levam a essa interação são extremamente complexas e requerem a expressão diferenciada de inúmeros genes regulados pela associação (VOIBLET et al., 2001; LE QUÉRÉ et al., 2005; MARTIN et al., 2008, 2010).

Estudos indicam que para o desenvolvimento dos estágios iniciais da simbiose, é necessária a expressão de genes (NEHLS et al., 1999; POLIDORI et al., 2002), síntese de proteínas e a ativação de algumas enzimas (BARKER et al., 1998). Acredita-se que na etapa de sinalização ocorra a síntese e o reconhecimento de proteínas específicas da simbiose (HILBERT et al., 1991; BURGESS et al., 1995; MARTIN et al., 2001; TAGU et al., 2002b).

Essas hipóteses foram inicialmente sustentadas por Hilbert et al. (1991), que atentaram para o aparecimento de proteínas expressas identificadas durante o processo da ectomicorrização, sendo, desde então, denominadas ectomicorrizinas. Em 1992, Guttenberger e Hampp sugeriram que as ectomicorrizinas poderiam ser um artefato do método utilizado para a obtenção da simbiose *in vitro*. Fatores como a diferença na composição do meio de cultura utilizado para o crescimento do fungo e a idade do tecido da planta, além do método inadequado para a extração de proteínas, poderia levar a um resultado falso positivo na complexa sucessão de eventos que é o estabelecimento da micorriza.

Martin et al. (2001) classificaram as moléculas que possivelmente controlam as interações entre os simbioses em 5 tipos:

- Moléculas que influenciam o tropismo das hifas para as raízes (sinais rizosféricos);
- Moléculas para o contato e invasão das hifas (adesinas e hidrolases);
- Elementos de indução de modificações organogênicas em ambos os parceiros (hormônios e sinais secundários);
- Moléculas facilitadoras da sobrevivência dos fungos em detrimento do sistema de defesa vegetal;
- Moléculas coordenadoras das estratégias para as trocas metabólicas, como colonização de células vegetais e ramificação do micélio no solo.

O uso de técnicas como os macro e microarranjos de cDNA, além de outras como o *Differential-Display Reverse Transcription - PCR* – DDRT-PCR, *Suppression Subtractive Hybridization* – SSH, em diferentes sistemas ectomicorrízicos tem gerado uma grande quantidade de dados e trazendo avanços na compreensão das etapas de reconhecimento e controle da simbiose (VOIBLET et al., 2001; DUPLESSIS et al., 2005; LE QUÉRÉ et al., 2005). Isso porque, através destas técnicas, é possível observar

e identificar a participação de milhares de genes ao mesmo tempo e relacioná-los com os diferentes estágios de formação da simbiose (VOIBLET et al., 2001; DUPLESSIS et al., 2005; JOHANSSON et al., 2004; LE QUÉRÉ et al., 2005; WRIGHT et al., 2005; Martin et al., 2008, 2010).

Através da tecnologia de microarranjos de cDNA para a observação do padrão de transcrição fúngica no sistema *Pisolithus tinctorius* - *Castanea sativa*, foi identificada a participação de vários genes com funções desconhecidas (ACIOLI-SANTOS et al., 2008). Um dos genes fúngicos identificados como estimulados na simbiose (Clone ID: 1440), batizado posteriormente de *PtSRR1* – *Pisolithus tinctorius* *symbiosis related receptor 1* - por apresentar uma expressão positiva entre 6-12h quando em indução micorrízica, teve sua porção 3' parcialmente caracterizada (ACIOLI-SANTOS et al., 2009). A análise preliminar do peptídeo traduzido de 75 aminoácidos (realizada através de interfaces bioinformáticas) apresentou similaridade a uma proteína superexpressa pelo fungo ectomicorrízico *Schizophyllum commune* em situação de baixa disponibilidade de N. Os dados bioquímicos também revelaram a possibilidade desta proteína estar envolvida no processo de reconhecimento “fungo-planta”, no desenvolvimento da simbiose, dada a forte possibilidade de ser esta uma proteína transmembranar. Embora haja indícios de que esta proteína esteja relacionada à colonização ectomicorrízica, não foi encontrado nenhum domínio conservado clássico de proteínas previamente caracterizadas, nem de estrutura cristalizada similar em bancos de dados para o peptídeo traduzido (ACIOLI-SANTOS et al., 2009).

A falta de informação e a ausência de dados para serem utilizados em análises comparativas refletem a carência de estudos e de pesquisadores especializados para essa linha de investigação. Com a modernização das técnicas de biologia molecular, foi gerada grande quantidade de dados (PODILA et al., 2002; LE QUÉRÉ et al., 2005), antes imperceptíveis devido às limitações das técnica então utilizadas.

Acioli-Santos et al. (2010) listaram 390 genes (ESTs – *expressed sequences tags*) de fungos ectomicorrízicos sob estimulação em oito categorias fisiológicas de acordo com suas prováveis funções e tendências de expressão no advento da simbiose: 1- crescimento e organização celular; 2- morfogênese; 3- metabolismo e energia; 4- síntese e interação protéica, regulação transcripcional e transducional; 5- transporte de íons, aminoácidos e peptídeos; 6- proteínas membranares estruturais e de sinalização; 7- processamento de DNA/RNA; 8- defesa e morte celular programada. Segundo os autores, para a formação da ectomicorriza haveria o surgimento de um novo programa

genético direcionado à simbiose, sob a influência dos fatores tempo, organismo e ambiente. Essa dinâmica de ativação e desativação dos conjuntos gênicos, em interação com o ambiente, irá determinar no decorrer do tempo o desenvolvimento da associação (VOIBLET et al., 2001; LE QUÉRÉ et al., 2005). Neste longo percurso que se inicia com a mobilização de moléculas sinalizadoras (TAGU & MARTIN, 1996) e vai até o início das trocas metabólicas, uma série de proteínas são sintetizadas e, como resultado final, tem-se uma associação plenamente estabelecida e funcional (LE QUÉRÉ et al., 2005).

Dentre as muitas necessidades da simbiose micorrízica está a formação de diversas estruturas (LE QUÉRÉ et al., 2005) e, para isso é necessária intensa atividade celular em benefício do crescimento e proliferação das células (BARKER et al., 1998). A ativação de alguns genes é relatada na literatura como parte deste processo e responsável por tais funções na célula. Podem-se destacar os genes responsáveis pela síntese das proteínas α -tubulina e actina, identificadas em micélio de *Suillus variegatus* e de *Paxillus involutus* em associação com *Pinus contorta*, ou em outros tecidos simbióticos (TIMONEN et al., 1996; TIMONEN & PETERSON, 2002). A α -tubulina pode estar relacionada com a formação dos microtúbulos, sendo estes responsáveis por dar forma à célula, além de participar do mecanismo de divisão celular (MONTEIRO & ROSSI, 1999). Também são encontrados em culturas celulares de rápido crescimento (CONDEELIS, 1995) genes que codificam fatores de transcrição e alongamento celular (*translation elongation fator 1 α*). Esta proteína atua na tradução da informação do RNA mensageiro em aminoácido levando ao ribossomo o tRNA correspondente. Em ectomicorriza formada com o fungo *P. tinctorius* em associação com *E. globulus* foram encontrados alguns transcritos deste gene (VOIBLET et al., 2001). Outros fatores de iniciação da tradução (*Translation initiation fator 3 Sui1p*, *Translation initiation SUI1*) e alongamento (*EF-1 gamma*, *Elongation fator*) foram observados em ectomicorrizas (LE QUÉRÉ et al., 2005) participando da síntese do peptídio como auxiliar do mRNA e tRNA (PHAN et al., 2001; SVITKIN et al., 2001). Antes de chegar ao ribossomo, o mRNA sofre maturação e retirada dos éxons, em um processo conhecido como *splicing* e a responsável por isso é a enzima *mRNA maturase b12* (SZCZEPANECK & LAZOWSKA, 1996) encontrada em ectomicorrizas de *P. tinctorius* - *Eucalyptus globulus* (VOIBLET et al., 2001). Há também o gene *U6 snRNA-associated/Sm-like protein Lsm8* que, ao contrário do anterior, atua no decaimento do mRNA, juntamente com outras enzimas de funções semelhantes (HE & PARKER, 2000).

No desenvolvimento e formação das estruturas como manto e rede de Hartig, dentre outras, o fungo necessita gastar uma grande quantidade de energia. Essa alta demanda energética pode ser mensurada em parte pelo grande número de genes expressos que estão relacionados ao metabolismo e obtenção de energia nesses fungos, como visto em muitos sistemas ectomicorrízicos (ACIOLI-SANTOS et al., 2009). Já foram identificados genes codificantes da enzima hexoquinase em *Paxillus involutus* em associação com *Betula pendula* (LE QUÉREÉ et al., 2005). Também foram identificadas três novas formas da hexoquinase em micélio de *Tuber borchii*, com função relacionada ao catabolismo das hexoses, e sendo ela a primeira enzima desta via de assimilação deste composto (CECCAROLI et al., 1999). Outras enzimas descritas em sistemas ectomicorrízicos, que estão relacionadas diretamente ao aumento do metabolismo celular e obtenção de energia são a enolase, encontradas em micélio de *Tuber borchii* associado com *Tilia platyphyllos* (BABBITT et al., 1996); oxidase do citocromo c, presentes nas ectomicorrizas de *Paxillus involutus* x *Betula pendula* (LE QUÉREÉ et al., 2005) e a fosfatase ácida, detectada no micélio de *Pisolithus tinctorius* compatível na formação da interação com *Eucalyptus urophylla* (LEI et al., 1990).

Esse alto gasto de energia necessário para a formação e manutenção da micorriza é justificado, em parte, pela funcionalidade das trocas metabólicas essenciais aos simbioses. Para dar suporte a isso, alguns genes participam deste processo como o *mitochondrial carrier protein* que atua no transporte de ânions fosfatados (PALMIERI, 1994). Os genes que codificam proteínas de canais iônicos, como o *calcium channel*, *Al voltage dependent calcium channel* e o *acid sensitive K⁺ channel*, *Ca²⁺ transporting ATPase*, como moléculas responsáveis pelo transporte de cálcio, garantem o suprimento de um elemento fundamental para a fisiologia das ectomicorrizas (KIM et al., 1999; PODILA et al., 2002). Também existem os genes de transporte de proteínas como o *ran interactin giant nucleopore protein*, *peptide transporter protein*, e o gene para a *β-importin* (PODILA et al., 2002). A proteína codificada por este último gene realiza o transporte de histonas (proteínas responsáveis pelo empacotamento do DNA, para que este caiba dentro da célula) do citoplasma para o núcleo celular (JAKEL et al., 1999).

Dentre as diversas proteínas sintetizadas por fungos ectomicorrízicos encontram-se as SRAPs e as hidrofobinas (LAURENT et al., 1999; ACIOLI-SANTOS et al., 2008). As SRAPs (*symbiosis related acid protein*) são proteínas que, possivelmente, fazem parte do sistema de adesão célula-a-célula e são necessárias na agregação das hifas à raiz hospedeira (LAURENT et al., 1999). Considera-se que essas proteínas são

estimuladas pela simbiose, durante a formação de ectomicorrizas entre *P. tinctorius* e *E. globulus*, sendo uma característica marcante no desenvolvimento deste tipo de associação (DUPLESSIS et al., 2005).

As hidrofobinas são proteínas encontradas em diversos sistemas micorrízicos (TAGU et al., 2001; DUPLESSIS et al., 2005; LE QUÉRÉ et al., 2005) e estão presentes na parede celular do fungo, mas podem, também, ser encontradas na interface extracelular. Estes polipeptídios de pequena massa molecular apresentam regiões que podem estar envolvidas no crescimento aéreo e agregação das hifas entre a espécie fúngica e o hospedeiro (TAGU & MARTIN, 1996; KERSHAW & TALBOT, 1998; WÖSTEN & VOCHT, 2000).

Uma das vantagens da associação ectomicorrízica para a planta é a aquisição de resistência a metais pesados (BRUNNER & FREY, 2000) e isso foi evidenciado pela identificação de genes codificantes da glutathione S transferase em alguns sistemas ectomicorrízicos (PODILA et al., 2002; JOHANSSON et al., 2004; LE QUÉRÉ et al., 2005). Também foram identificados os genes da metalotioneína (HAERSLEV et al., 1995) e arsenito ATPase (MOREL et al., 2005), que podem atuar no metabolismo de certos compostos xenobióticos de difícil assimilação pelas plantas e, graças a esses genes, a célula realiza a desintoxicação e combate o estresse oxidativo, o envelhecimento e a morte (HAYES & PULFORD, 1995; CATANEO et al., 2003).

Segundo Acioli-Santos et al. (2010), o tecido simbiótico final resulta da interação físico/química entre raízes e células fúngicas, sendo produto da regulação espaço-temporal dos dois programas genéticos, os quais envolvem sensoriamento ambiental, comunicação célula-célula e construção de novas estruturas.

Estudos baseados no padrão de transcrição fúngica têm contribuído decisivamente na elaboração de teorias e elucidação preliminar das vias de sinalização utilizadas pelos fungos durante as diferentes fases da micorrização (VOIBLET et al., 2001; DUPLESSIS et al., 2005; LE QUÉRÉ et al., 2005). A partir desses trabalhos, as pesquisas atuais podem focar em proteínas-alvo potencialmente importantes para associação, com vistas a estudos funcionais e de cunho biotecnológico.

Pelo apresentado e diante das novas descobertas no campo da expressão dos genes regulados ou influenciados pela simbiose (VOIBLET et al., 2001; PETER et al., 2003; DUPLESSIS et al., 2005; LE QUÉRÉ et al., 2005), faz-se necessário entender o papel dos inúmeros genes, em destaque aqueles de função desconhecida (PODILA et al., 2002; MENOTTA et al., 2004; JOHANSSON et al., 2004, ACIOLI-SANTOS et al.,

2008; MARTIN et al., 2008, COELHO et al., 2010), bem como relacioná-los ao advento da simbiose (SMITH & READ, 2008). A elucidação parcial do mecanismo de formação das ectomicorrizas poderá influenciar diretamente na maneira como essas associações são utilizadas nas diversas atividades econômicas, biotecnológicas e de conservação ambiental.

REFERÊNCIAS

- ACIOLI-SANTOS, B. Expressão gênica no fungo *Pisolithus tinctorius* em etapas iniciais da interação ectomicorrízica com *Castanea sativa*: estudo do padrão de transcrição e de possíveis fatores de regulação da simbiose. Lisboa: Universidade de Lisboa, Departamento de Biologia Vegetal (Tese), 169 p., 2006.
- ACIOLI-SANTOS, B.; MALOSSO, E.; CALZAVARA-SILVA, C.E.; LIMA, C.E.P.; FIGUEIREDO, A.; SEBASTIANA, M.; PAIS, M.S. *PtSRRI*, a putative *Pisolithus tinctorius* symbiosis related receptor gene is expressed during the first hours of mycorrhizal interaction with *Castanea sativa* roots. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.40(2), p. 292-295, 2009.
- ACIOLI-SANTOS, B.; SEBASTIANA, M.; PESSOA, F.; SOUSA, L.; FIGUEIREDO, A.; FORTES, A.M.; BALDE, A.; MAIA, L.C.; PAIS, M.S. Fungal Transcript Pattern During the Preinfection Stage (12 h) of Ectomycorrhiza Formed Between *Pisolithus tinctorius* and *Castanea sativa* Roots, Identified Using cDNA Microarrays. **Current Microbiol**, v.57, p.620-625, 2008.
- ACIOLI-SANTOS, B.; VIEIRA, H.E.E.; LIMA, C.E.P.; MAIA, L.C. The Molecular Ectomycorrhizal Fungus Essence In Association: A Review Of Differentially Expressed Fungal Genes During Symbiosis Formation. In: Eds. M.K. Rai and A.K. Varma. (Org.). **Diversity and Biotechnology of Ectomycorrhiza**. 1Ed. New York: Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 2010.
- ALEXANDRE, J.R.; OLIVEIRA, M.L.F.; DOS SANTOS, T.C.; CANTON, G.C., DA CONCEIÇÃO, J.M.; EUTRÓPIO, F.J.; CRUZ, Z.M.A.; DOBBSS, L.B.; RAMOS, A.C. Zinco e ferro: de micronutrientes a contaminantes do solo. **Natureza on line**, v.1, p. 23-28, 2012.
- ALVES, J. R.; SOUZA, O.; PODLECH, P. A. S.; GIACHINI, A. J.; OLIVEIRA, V. L. Efeito de inoculante ectomicorrízico produzido por fermentação semi-sólida sobre o crescimento de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 2, p.307-313, 2001.
- ANDERSON, I.C.; CAIRNEY, J.W. Ectomycorrhizal fungi: exploring the mycelial frontier. **FEMS Microbiol Rev**, v. 31, p. 388-406, 2007.

- ARTURSSON, V.; FINLAY, R.D.; JANSSON, J.K. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. **Environmental Microbiology**, v.8, p.1-10, 2006.
- ASHFORD, A.E.; LING LEE, M.; CHILVERS, G.A. Polyphosphate in eucalypt mycorrhizas: a cytochemical demonstration. **New Phytol.** v.74, p.447-453, 1975.
- ASHFORD, A.E.; PETERSON, R.L.; DWARTE, D.; CHILVERS, G.A. Polyphosphate granules in eucalypt mycorrhizas: determination by energy dispersive x-ray analysis. **Can. J. Bot.** v.64, p.677-687, 1986.
- AUGÉ, R. M. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Mycorrhiza**, v.11, p.3-42, 2001.
- BABBITT, P. C.; HASSON, M. S.; WEDEKIND, J. E.; PALMER, D. J.; BARRETT, W. C.; REED, G. H.; RAYMENT, I.; RINGE, D.; KENYON, G. L.; GERLT, J. A. The enolase superfamily: a general strategy for enzyme-catalyzed abstraction of the protons of carboxylic acids. **Biochemistry**, v.35, p.16489-16501, 1996.
- BAGO, B.; PFEFFER, P. E.; ZIPFEL, W.; LAMMERS, P.; SHACHAR-HILL, H. Tracking metabolism and imaging transport in arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and soil**, v. 244, p.189-197, 2002.
- BARKER, S. J.; DUPLESSIS, S.; TAGU, D. The application of genetic approaches for investigations of mycorrhizal symbiosis. **Plant and Soil**, v.244, p.85-95, 2002
- BARKER, S. J.; TAGU, D. The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbioses. **Jornal of Plant Growth Regulation**, v.19, p.144-154, 2000.
- BARKER, S.J.; TAGU, D.; DELP, G. Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbiosis. **Plant Physiology**, v.116, p.1201-1207, 1998.
- BARROSO, J.; NEVES, H.C.; PAIS, M.S. Production of indole-3-ethanol and indole-3-acetic acid by the mycorrhizal fungus of *Ophrys lutea* (Orchidaceae). **The New Phytologist**, v.103, p.745-749, 1986.
- BELLEI, M.M.; CARVALHO, E.M.S. Ectomicorrizas. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. (Coord.). Microbiologia do Solo. **Sociedade Brasileira do Solo**, p.297-318, 1992.
- BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. Biochemistry. 7th. Ed. International Edition. **W.H. Freeman and Company**. New York, 2012.
- BLEDSON, C.S.; RYGIWICZ, P.T. Ectomycorrhizas affect ionic balance during ammonium uptake by Douglas-fir roots. **New Phytologist**, v.102, p.271-283, 1986.

- BONFANTE-FASOLO, P.; SPANU, P. Pathogenic and endomycorrhizal association. In: MORRIS, J. R.; READ, D.; VARMA, A. K. (Eds.). **Techniques for Mycorrhizal Research - Methods in Microbiology**. Academic Press, London, p.602-628, 1994.
- BRUNDRETT, M.C. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. **New Phytologist**, v.154, p.275-304, 2002.
- BRUNDRETT, M.C. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. **Plant and Soil**, v.320, p. 27-77, 2009.
- BRUNNER, I. Ectomycorrhizas: their role in forest ecosystems under the impact of acidifying pollutants. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**. v.4, n.1, p.13-27, 2001.
- BRUNNER, I.; FREY, B. Detection and localization of aluminum and heavy metals in ectomycorrhizal Norway spruce seedlings. **Environmental Pollution**, v.108, p.121-128, 2000.
- BÜCKING, H.; HANS, R.; HEYSER, W. The apoplast of ectomycorrhizal roots – site of nutrient uptake and nutrient exchange between the symbiotic partners. *The Apoplast of Higher Plants: Compartment of Storage, Transport and Reactions*. p.97-108, 2007.
- BÜCKING, H.; HEYSER, W. Elemental composition and function of polyphosphates in ectomycorrhizal fungi – an X-ray microanalytical study. **Mycol. Res.** v.103, p. 31-39, 1999.
- BÜCKING, H.; HEYSER, W. Microradiographic localization of phosphate and carbohydrates in mycorrhizal roots of *Populus tremula* × *Populus alba* and the implications for transfer processes in ectomycorrhizal associations. **Tree Physiology**. v.21, p.101-107, 2001.
- BÜCKING, H.; LIEPOLD, E.; AMBILWADE, P. The Role of the Mycorrhizal Symbiosis in Nutrient Uptake of Plants and the Regulatory Mechanisms Underlying These Transport Processes. **Agricultural and Biological Science**, Chapter 4, 2012.
- BURGESS, T.; LAURENT, P.; DELL, B.; MALAJCZUK, N.; MARTIN, F. Effect of fungal-isolate aggressivity on the biosynthesis of symbiosis-related polypeptides in differentiating eucalypt ectomycorrhizas. **Planta**, v.195, p.408-417, 1995.
- CAIRNEY, J. W. G. Evolution of mycorrhizal systems. **Naturwissenschaften**, v.87, p.467-475, 2000.

- CAIRNEY, J. W. G. *Pisolithus*-death of the pan global super fungus. **New Phytologist**, v.153, p.199-211, 2002.
- CAIRNEY, J. W. G.; CHAMBERS S. M. Interactions between *Pisolithus tinctorius* and its hosts: a review of current knowledge. **Mycorrhiza**, v.7, p. 117-131, 1997.
- CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. Microbiologia do Solo. Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, Campinas (SP), 1992.
- CATANEO, A.C.; DÉSTRO, G.F.G.; FERREIRA, L.C.; CHAMMA, K.L.; SOUSA, D.C.F. Glutathione S-transferase activity on the degradation of the herbicide glyphosate in maize (*Zea mays*) plants. **Planta Daninha**, v.21, n.2, p.307-312, 2003.
- CECCAROLI, P.; SALTARELLI, R.; BUFFALINNE, M.; PICOLLI, G.; STOCCHI, V. Three different forms of hexokinase are identified during *Tuber borchii* mycelium growth. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.194, n.1-2, p.71-77, 1999.
- CHALOT, M.; JAVELLE, A.; BLAUDEZ, D.; LAMBILLIOTE, R.; COOKE, R.; SENTENAC, H.; WIPF, D.; BOTTON, B. An update on nutrient transport process in ectomycorrhizas. **Plant and Soil**, v.244, p.165-175, 2002.
- CHEN, X.Y.; HAMPP, R. Sugar uptake by protoplasts of the ectomycorrhizal fungus, *Amanita muscaria* (L. ex fr.) Hooker. **New Phytologist**, v.125, p.601-608, 1993.
- CHILVERS, G.A. Some distinctive types of eucalypt mycorrhiza. **Australian Journal of Botany**, v.16, p.49-70, 1968.
- CHRISTIE, P.; LI, X.; CHEN, B. Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc. **Plant and Soil**, v.261, p.209-217, 2004.
- COELHO, I.S.; QUEIROZ, M.V.; COSTA, M.D.; KASUYA, M.C.M., ARAÚJO, E.F. Identification of differentially expressed genes of the fungus *Hydnangium* sp. during the pre-symbiotic phase of the ectomycorrhizal association with *Eucalyptus grandis*. **Mycorrhiza**, v. 20, p.531-540, 2010.
- CONDEELIS, J. Elongation factor 1 α , translation and the cytoskeleton. **Trends in Biochemical Sciences**, v.20, p.169-170, 1995.
- CORDIER, C.; POZO, M. J.; BAREA, J. M.; GIANINAZZI,S.;GIANINAZZI-PEARSON, V. Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 11, p.1017-1028, 1998.

- COSTA, M.D.; PEREIRA, O.L.; KASUYA, M.C.M.; BORGES A.C. Ectomicorrizas: a face oculta das florestas. Aplicações biotecnológicas das ectomicorrizas na produção vegetal. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 29: 38-45, 2002.
- CRAFT, C.B.; MILLER, C.O. Detection and quantification of cytokinins produced by mycorrhizal fungi. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 54, p. 586-588, 1974.
- CULLINGS, K.; MAKHIJA, S. Ectomycorrhizal Fungal Associates of *Pinus contorta* in Soils Associated with a Hot Spring in Norris Geyser Basin, Yellowstone National Park, Wyoming. **Applied and Environmental Microbiology**, p.5538-5543, 2001.
- DAHLBERG, A. Community ecology of ectomycorrhizal fungi: an advancing interdisciplinary field. **New Phytologist**, v.150, p.555-562, 2001.
- DITENGOU, F. A.; LAPEYRIE, F. Hypahorine from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* counteracts activities of indole-3-acetic acid and ethylene but not synthetic auxins in *Eucalyptus* seedlings. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v.13, p.151-158, 2000.
- DITENGOU, F. A.; RAUDASKOSKI, M.; LAPEYRIE, F. Hypahorine, an indole-3-acetic acid antagonist delivered by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, induces reorganization of the actin and the microtubule cytoskeleton in *Eucalyptus globulus* ssp. *biscotata* root hairs. **Planta**, v.218, n.2, p.217-225, 2003.
- DUCHESNE, L.C.; PETERSON, R.L.; ELLIS, B.E. Interaction between the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* and *Pinus resinosa* induces resistance to *Fusarium oxysporum*. **Canadian Journal of Botany**, v.66, n.3, p. 558-562, 1988.
- DUDDRIDGE, J.A.; READ, D.J. The development and ultrastructure of ectomycorrhizas. I Ectomycorrhizal development on pine in the field. **New Phytologist**, v.96, p.565-573, 1984.
- DUPLESSIS, S.; COURTY, P.; TAGU, D.; MARTIN, F. Transcript patterns associated with ectomycorrhiza development in *Eucalyptus globulus* and *Pisolithus microcarpus*. **New Phytologist**, v.165, p.599-611, 2005.
- ENGEL, V.L.; PARROTTA, J.A. An evaluation of direct seeding for reforestation of degraded lands in central São Paulo state, Brazil. **Forest Ecology and Management**, v.152, p.169-181, 2001.
- EZAWA, T.; SMITH, S.E.; SMITH, F.A. P metabolism and transport in AM fungi. **Plant and Soil**, v.244, p.221-230, 2002.

- FEUGEY, L.; STRULLU, D.G.; POUPARD, P.; SIMONEAU, P. Induced defence responses limit Hartig net formation in ectomycorrhizal birch roots. **New Phytologist**, v.144, p.541-547, 1999.
- FRANK, A. B. Über die aufwurzelymbiose beruhend. Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilz. Ber.dt. **Bot. Ges**, v.3, p.128-145, 1885.
- FRANK, A.B. Die Bedeutung der Mykorrhiza Pilze für die gemeine Kiefer. **Forstwissenschaftliches Centralblatt**, v.16, p.1852-1890, 1894.
- GARBAYE, J. Competitivité des champignons ectomycorhiziens: premiers résultats et application à la sélection de souches pour la mycorhization contrôlée du hêtre et du chêne rouvre dans le nord-est de la France. **Revue Forestière Française**. v.6, p.33-43, 1984.
- GIACHINI, A.J.; OLIVEIRA, V.L.; CASTELLANO, M.A.; TRAPPE, J.M. **Ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* and *Pinus* plantations in Southern Brazil. *Mycologia***, v.92, n.6, p.1166-1177, 2000.
- GIACHINI, A.J.; SOUZA, L.A.B.; OLIVEIRA, V.L. Species richness and seasonal abundance of ectomycorrhizal fungi in plantations of *Eucalyptus dunnii* and *Pinus taeda* in southern Brazil. **Mycorrhiza**, v.14, p.375-381, 2004.
- GOGALA, N. Regulation of mycorrhizal infection by hormonal factors produced by hosts and fungi. **Experientia**, v.47, p.331-340, 1991.
- GROSS, E.; CASAGRANDE, L.I.T.; CAETANO, F.H. Ultrastructural study of ectomycorrhizas on *Pinus caribaea* Morelet. var. *hondurensis* Barr. & Golf. seedlings. **Acta botanica brasílica**, v.18, n.1, p.1-7. 2004.
- GUTTENBERGER, M.; HAMPP, R. Ectomycorrhizins - symbiosis-specific or artifactual polypeptides from ectomycorrhizas. **Planta**, v.188, p.129-136, 1992.
- HAERSLEV, T.; JACOBSON, G.K.; ZEDELER, K. The prognostic significance of immunohistochemically detectable metallothionein in primary breast carcinomas. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v.103, n.4, p.279-285, 1995.
- HALL, I.R.; WANG, Y.; AMICUCCI, A. Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. **Trends in Biotechnology**, v.21, n.10, p.433-438, 2003.
- HAYES, J.D.; PULFORD, D.J. The glutathione s-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.30, n.6, p.445-600, 1995.

- HE, W.; PARKER, R. Functions of Lsm proteins in mRNA degradation and splicing. **Current Opinion in Cell Biology**, v.12, n.3, p.346-350, 2000.
- HILBERT, J.L.; COSTA, G.; MARTIN, F. Ectomycorrhizal synthesis and polypeptide changes during the early stage of eucalypt mycorrhiza development. **Plant Physiology**, v.97, p.977-984, 1991.
- HORTON, T.R.; BRUNS, T.D. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. **Molecular Ecology**, v.10, p.1855-1871, 2001.
- JAKEL, S.; ALBIG, W.; KUTAY, U.; BISCHOFF, F.R.; SCHWAMBORN, K.; DOENECKE, D.; GORLICH, D. The importin β /importin 7 heterodimer is a functional nuclear import receptor for histone H1. **The European Molecular Biology Organization Journal**, v.18, n.9, p.2411-2423, 1999.
- JOHANSSON, T.; LE QUÉRÉ, A.; AHREN, D.; SÖDERSTRÖM, B.; ERLANDSSON, R.; LUNDEBERG, J.; UHLÉN, M.; TUNLID, A. Transcriptional responses of *Paxillus involutus* and *Betula pendula* during formation of ectomycorrhizal root tissue. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v.17, n.2, p.202-205, 2004.
- KERSHAW, M.J.; TALBOT, N.J. Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. **Fungal Genetics and Biology**, v.23, p.18-33, 1998.
- KIM, S.; SHIVANAND, T.; PODILA, G. Cloning and identification of symbiosis-regulated genes from the ectomycorrhizal *Laccaria bicolor*. **Mycological Research**, v.103, n.2, p.168-172, 1999.
- KOHZU, A.; TATEISHI, T.; YAMADA, A.; KOKA, K.; WAD, E. Nitrogen Isotope Fractionation during Nitrogen Transport from Ectomycorrhizal Fungi, *Suillus granulatus*, to the Host Plant, *Pinus densiflora*. **Soil Sci. Plant Nutr.**, v.46, p.733-739, 2000.
- KRAIGHER, H.; GRAYLING, A.; WANG, T.L.; HANKE, D.E. Cytokinin production by two ectomycorrhizal fungi in liquid culture. **Phytochemistry**, v.30, p.2249-2254, 1991.
- LAGRANGE, H.; JAY-ALLGMAND, C.; LAPEYRIE, F. Rutin, the phenolglycoside from eucalyptus roots exudates, stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentrations. **New Phytologist**, v.149, p.349-355, 2001.
- LANDEWEERT, R.; HOFFLAND, E.; FINLAY, R. D.; KUYPER, T. W.; BREEMEN N. V. Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from mineral. **Trends in Ecology & Evolution**, v.16, n.5, p.248-254, 2001.

- LAPEYRIE, F.; PICATTO, C.; GERARD, J.; DEXHEIMER, J.T.E.M. Study of intracellular and extracellular calcium oxalate accumulation by ectomycorrhizal fungi in pure culture or in association with *Eucalyptus* seedlings. **Symbiosis**, v.2, p.163-166, 1990.
- LAPEYRIE, F.; RANGER, J.; VAIRELLES, D. Phosphate-solubilizing activity of ectomycorrhizal fungi *in vitro*. **Canadian Journal of Botany**, v.69, p.342-346, 1991.
- LAURENT, P.; VOIBLET, C.; TAGU, D.; CARVALHO, D.; NEHLS, U.; DE BELLIS, R.; BALESTRINI, R.; BAUW, G.; BONFANTE, P.; MARTIN, F. A novel class of ectomycorrhiza-regulated cell wall polypeptides in *Pisolithus tinctorius*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.12, n.10, p.862-871, 1999.
- LE QUÉRÉ, A.; SCHÜTZENDÜBEL, A.; RAJASHEKAR, B.; CANBÄCK, B.; HEDH, J.; ERLAND, S.; JOHANSSON, T.; TUNLID, A. Divergence in gene expression related to variation in host specificity of an ectomycorrhizal fungus. **Molecular Ecology**, v.13, p.3809-3819, 2004.
- LE QUÉRÉ, A.; WRIGHT, D. P.; SÖDERSTRÖM, B.; TUNLID, A.; JOHANSSON, T. Global patterns of gene regulation associated with the development of ectomycorrhiza between birch (*Betula pendula* Roth.) and *Paxillus involutus*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.18, p.659-673, 2005.
- LEI, J.; LAPEYRIE, F.; MALAJCZUK, N.; DEXHEIMER, J. Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch on roots of *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake *in vitro*. II. Ultrastructural and biochemical changes at the early stage of mycorrhizal formation. **New Phytologist**, v.116, p.115-122, 1990.
- LIMA, W. P. **Impacto Ambiental do Eucalipto**. 2.ed. São Paulo, Brazil: EDUSP, p.301, 1993.
- LUDWIG-MÜLLER, J. Hormonal Balance in Plants During Colonization by Mycorrhizal Fungi. **Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function**, p.263-285, 2000.
- MAGATON, A. S.; PILO-VELOSO, D.; COLODETTE, J. L. Caracterização das *O*-acetil-(4-*O*-metilglicurono)xilanas isoladas da madeira de *Eucalyptus urograndis*. **Química Nova** [online], v.31, n.5, p.1085-1088, 2008.
- MARJANOVIĆ, Ž.; NEHLS, U. Ectomycorrhiza and Water Transport. **Mycorrhiza**, p.149-159, 2008.
- MARSCHNER, H. Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. **Plant-Soil Interactions at Low pH Developments in Plant and Soil Sciences**. v.45, p. 683-702, 1991.

- MARSCHNER, H.; DELL, B. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. **Plant and Soil**, v.159, p.89-102, 1994.
- MARTIN, F.; AERTS, A.; AHRE'N, D.; BRUN, A.; DANCHIN, E.G.J.; DUCHAUSSOY, F.; GIBON, J.; KOHLER, A.; LINDQUIST, E.; PEREDA, V.; SALAMOV, A.; SHAPIRO, H.J.; WUYTS, J.; BLAUDEZ, D.; BUE'E, M.; BROKSTEIN, P.; CANBECK, B.; COHEN, D.; COURTY, P.E.; COUTINHO, P.M.; DELARUELLE, C.; DETTER, J.C.; DEVEAU, A.; DIFAZIO, S.; DUPLESSIS, S.; TACHET, L. F.; LUCIC, E.; KLETT, P.F.; FOURREY, C.; FEUSSNER, I.; GAY, G.; GRIMWOOD, J.; HOEGGER, P.J.; JAIN, P.; KILARU, S.; LABBE', J.; LIN, Y.C.; LEGUE', V.; LE TACON, F.; MARMEISSE, R.; MELAYAH, D.; MONTANINI, B.; MURATET, M.; NEHLS, U.; HIRZEL, H.N.; LE SECQ, M.P.O.; PETER, M.; QUESNEVILLE, H.; RAJASHEKAR, B.; REICH, M.; ROUHIER, N.; SCHMUTZ, J.; YIN, T.; CHALOT, M.; HENRISSAT, B.; KUES, U.; LUCAS, S.; PEER, Y.V.; PODILA, G.K.; POLLE, A.; PUKKILA, P.J.; RICHARDSON, P.M.; ROUZE, P.; SANDERS, I.R.; STAJICH, J.E.; TUNLID, A.; TUSKAN, G.; GRIGORIEV, I.V. The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. **Nature**, v.452, p.88-92, 2008.
- MARTIN, F.; DUPLESSIS, S.; DITENGOU, F.; LAGRANGE, H.; VOIBLET, C.; LAPEYRIE, F. Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signal and communication genes. **New Phytologist**, v.151, p.145-154, 2001.
- MARTIN, F.; KOHLER, A.; MURAT, C.; BALESTRINI, R.; COUTINHO, P.M.; JAILLON, O.; MONTANINI, B.; MORIN, E.; NOEL, B.; PERCUDANI, R.; PORCEL, B.; RUBINI, A.; AMICUCCI, A.; AMSELEM, J.; ANTHOUARD, V.; ARCIONI, S.; ARTIGUENAVE, F.; AURY, J.M.; BALLARIO, P.; BOLCHI, A.; BRENNNA, A.; BRUN, A.; BUÉE, M.; CANTAREL, B.; CHEVALIER, G.; COULOUX, A.; DA SILVA, C.; DENOEUDE, F.; DUPLESSIS, S.; GHIGNONE, S.; HILSELBERGER, B.; IOTTI, M.; MARÇAIS, B.; MELLO, A.; MIRANDA, M.; PACIONI, G.; QUESNEVILLE, H.; RICCIONI, C.; RUOTOLO, R.; SPLIVALLO R.; STOCCHI, V.; TISSERANT, E.; VISCOMI, A.R.; ZAMBONELLI, A.; ZAMPIERI, E.; HENRISSAT, B.; LEBRUN, M.H.; PAOLOCCI, F.; BONFANTE, P.; OTTONELLO, S.; WINCKER, P. Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. **Nature**, v.464, p.1033-1038, 2010.
- MARTIN, F.; LAURENT, P.; CARVALHO, D.; VOIBLET, C.; BALESTRINI, R.; BOFANTE, P.; TAGU, D. Cell wall proteins of the ectomycorrhizal basidiomycete

- Pisolithus tinctorius*: identification, function, and expression in symbiosis. **Fungal Genetics and Biology**, v.27, p.161-174, 1999.
- MARTIN, F.; TAGU, D. Developmental biology of a plant-fungus symbiosis: the ectomycorrhiza. In: VARMA, A. K., HOCK, B. eds. **Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology**. 2ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 51-73, 1999.
- MARTIN, F.M.; HILBERT, J.L. Morphological, biochemical and molecular changes during ectomycorrhiza development. **Experientia**, v.47, p.321-331, 1991.
- MARTINS A.; BARROSO, J.; PAIS, M.S. Effect of ectomycorrhizal fungi on survival and growth of micropropagated plants and seedlings of *Castanea sativa* mill. **Mycorrhiza**, v.6, p.265-270, 1996.
- MARX, D.H. Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infection. **Annual Review of Phytopathology**, v.10, p.426-434, 1972.
- MARX, D.H.; RUEHLE, J.L.; CORDELL, C.E. **Methods for studying nursery and field response of trees to specific ectomycorrhiza**. In: Methods in Microbiology., Ed. NORRIS, J. R.; READ, D. J.; VARMA, A. K. Academic Press, Londres. v.23, p.383-411, 1991.
- MELLO, A.H.; ANTONIOLLI, Z.I.; KAMINSKI, J., SOUZA, E.L.; OLIVEIRA, V.L. Fungos arbusculares e ectomicorrízicos em áreas de eucalipto e de campo nativo em solo arenoso. **Ciência Florestal**, v.16, p.293-301, 2006.
- MENOTTA, M.; AMICUCCI, A.; SISTI, D.; GIOACCHINI, A.M.; STOCCHI, V. Differential gene expression during pre-symbiotic interaction between *Tuber borchii* Vittad. and *Tilia Americana* L. **Current Genetics**, v.46, p.158-165, 2004.
- MERCADANTE, R.; CAPO, P. **O papel**, n.8, v.4 , 2006.
- MILLER, C.O. Cytokinin production by mycorrhizal fungi. In: HACSKAYLO, E. (Ed.). **Mycorrhizae**, Washington: United States Government Printing Office, p.168-174, 1971.
- MOLINA, R.; MASSICOTE, H.; TRAPPE, J.M. Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community-ecological consequences and practical implications. In: Allen MF (Eds), **Mycorrhizal Functioning-anintegrative plant-fungal process**. **Chapman and Hall**, NewYork, p.357-423, 1992.
- MONTEIRO, C.A.; ROSSI, N.M.M. The nucleation of microtubules in *Aspergillus nidulans* germlings. **Genetics and Molecular Biology**, v.22, n.3, p.309-313, 1999.

- MOREL, M.; JACOB, C.; KOHLER, A.; JOHANSSON, T.; MARTIN, F.; CHARLOT, M.; BRUN, A. Identification of genes differentially expressed in extraradical mycelium and ectomycorrhizal roots during *Paxillus involutus* - *Petula pendula* ectomycorrhizal symbiosis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.382-391, 2005.
- MOYERSON, B.; BECKER, P.; ALEXANDER, I.J. Are ectomycorrhizas more abundant than arbuscular mycorrhizas in tropical heath forests? **New Phytologist**, v. 150, p.591-599, 2001.
- NEHLS, U.; BOCK, A.; EINIG, W.; HAMPP, R. Excretion of two proteases by the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. **Plant, Cell and Environment**, v.24, p. 741-747, 2001.
- NEHLS, U.; MIKOLAJEWSKI, S.; ECKE, M.; HAMPP, R. Identification and expression analysis of two fungal cDNA regulated by ectomycorrhiza and fruit body formation. **New Phytologist**, v.144, p.195-202, 1999.
- NG, P.P.; COLE, A.L.J.; JAMERSON, P.; MCWHA, J.A. Cytokinin production by ectomycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v.91, p.57-62, 1982.
- NIEMI, K.; VUORINEN, T.; ERNSTSEN, A; HÄGGMAN, H. Ectomycorrhizal fungi and exogenous auxins influence root and mycorrhiza formation of Scots pine hypocotyl cuttings *in vitro*. **Tree Physiology**, v.22, p.1231-1239, 2002.
- OLIVEIRA, V.L.; ROSSI, M.J.; TARGHETTA, B.L. **Avanços na aplicação de ectomicorrizas**. In: Márcia do Vale Barreto Figueiredo; Hélio Almeida Burity; Newton Pereira Stamford; Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos. (Org.). *Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura*. Guaíba: Agrolivros, p.297-331, 2008.
- OLIVEIRA, V.L.; SCHMIDT, V.D.B.; GOMES, N.C.; MAIA, D.C. Spécificité de champignons ectomycorhiziens vis-à-vis d. *Eucalyptus viminalis* Labill et *E. dunnii* Maiden. **Agronomie**, 14 :57-62, 1994.
- PALMIERI, F. Mitochondrial carrier proteins. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v.346, p.48-54, 1994.
- PETER, M.; COURTY, P.; KOHLER, A.; DELARUELLE, C.; MARTIN, D.; TAGU, D.; FREY-KLETT, P.; DUPLESSIS, S.; CHALOT, M.; PODILA, G.; MARTIN, F. Analysis of expressed sequence tags from the ectomycorrhizal basidiomycetes *Laccaria bicolor* and *Pisolithus microcarpus*. **New Phytologist**, v.159, p.117-129, 2003.

- PETERSON, R.L.; BONFANTE, P. Comparative structure of vesicular-arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas. **Plant Soil**, v.159, p.79-88, 1994.
- PETERSON, R.L.; MASSICOTTE, H.B.; MELVILLE, L.H. Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology. **NRC Research Press**. ISBN 0-660-19087-7, 2004.
- PHAN, L.; SCHOENFELD, L.W.; VÁLÁSEK, L.; NIELSEN, K. H.; HINNEBUSCH, A. G. A subcomplex of three eIF3 subunit binds eIF1 and eIF5 and stimulates ribosome binding of mRNA tRNAⁱ_{met}. **The European Molecular Biology Organization Journal**, v.20, n.11, p.2954-2965, 2001.
- PLASSARD, C.; BONAFOS, B.; TOURAINE, B. Differential effects of mineral and organic N sources, and of ectomycorrhizal infection by *Hebeloma cylindrosporum*, on growth and N utilization in *Pinus pinaster*. **Plant, Cell and Environment**, v.23, p. 1195–1205, 2000.
- PODILA, G. K.; ZHENG, J.; BALASUBRAMANIAN, S.; SUNDARAM, S.; HIREMATH, S.; BRAND, J. H.; HYMES, M. J. Fungal gene expression in early symbiotic interactions between *Laccaria bicolor* and red pine. **Plant and Soil**, v.244, p.117-128, 2002.
- POLIDORI, E.; AGOSTINI, D.; ZEPPA, S.; POTENZA, L.; PALMA, F.; SISTI, D.; STOCCHI, V. Identification of differentially expressed cDNA clones in *Tilia platyphyllos-Tuber borchii* ectomycorrhizae using a differential screening approach. **Molecular Genetics and Genomics**, v.266, p.858-864, 2002.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICCHORN, S.E. **Biologia Vegetal**, 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.928, 2007.
- ROSSI, M.J.; SOUZA, J.A.R.; OLIVEIRA, V.L. Inoculum production of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* in an airlift bioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.59, p.175-181, 2002.
- SCHÜßLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, v. 105, p.1413-1421, 2001.
- SELOSSE, M.A.; BAUDOIN, E.; VANDENKOORNHUYSE, P. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. **Comptes Rendus Biologies**, v.327, n.7, p.639-648, 2004.
- SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. **Biociência do Solo. Fundamentos e Perspectivas**. ESAL/ FAEP, Lavras-Brasil, p.236, 1988.

- SLANKIS, V. Soil factors influencing formation of mycorrhizae. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.12, p.437-457, 1974.
- SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis**, 3rd ed. USA: Academic Press, 2008.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA (São Paulo, SP). ANPEC apresenta os números de 93. **Silvicultura**, São Paulo, v. 54, p. 10-11, 1994.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA (São Paulo, SP). Luiz Kaufmann: setor não aproveita seu potencial. **Silvicultura**, São Paulo, v.69, p.7-11, 1997.
- SOUZA, V. C.; SILVA, R. A.; CARDOSO, G. D.; BARRETO, A. F. Studies on mycorrhizal fungi. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.10, p.612-618, 2006.
- STRULLU, D.G.; HARLEY, J.L.; GOURRET, J.P.; GARREC, J.P. Ultra-structure and microanalysis of the polyphosphate granules of the ectomycorrhizas of *Fagus sylvatica*. **New Phytol.** v.92, p.417-423, 1982.
- SVITKIN, Y. V.; PAUSE, A.; HAGHIGHAT, A.; PYRONNET, S.; WITHERELL, G.; BELSHAM, G. J.; SONENBERG, N. The requirement for eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) in translation is in direct proportion to the degree of mRNA 5' secondary structure. **RNA**, v.7, p.382-394, 2001.
- SZCZEPANECK, T.; LAZOWSKA, J. Replacement of two non-adjacent amino acid in the *S. cerevisiae* bi2 intron-incoded RNA maturase is sufficient to gain a homing-endonuclease activity. **The European Molecular Biology Organization Journal**, v.15, n.14, p.3758-3767, 1996.
- TAGU, D.; DE BELLIS, R.; BALESTRINI, R.; DE VRIES, O. M. H.; PICCOLI, G.; STOCCHI, V.; BONFANTE, P.; MARTIN, F. Immunolocalization of hydrophobin HYDPT-1 from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius* during colonization of *Eucalyptus globulus* roots. **New Phytologist**, v.149, p.127-135, 2001.
- TAGU, D.; LAPEYRIE, F.; MARTIN, F. The ectomycorrhizal symbiosis: genetics and development. **Plant and Soil**, v.244, p.97-105, 2002a.
- TAGU, D.; MARMEISSE, R.; BAILLET, Y.; RIVIERE, S.; PALIN, B.; BERNARDINI, F.; MEREAU, A.; GAY, G.; BALESTRINI, R.; BONFANTE, P.; MARTIN, F. Hydrophobins in ectomycorrhizas: heterologous transcription of the *Pisolithus* HydPt-1 gene in yeast and *Hebeloma cylindrosporum*. **European journal histochemistry**, v.46, n.1, p.23-29, 2002b.

- TAGU, D.; MARTIN, F. Molecular analysis of cell wall proteins expressed during the early steps of ectomycorrhiza development. **New Phytologist**, v.133, n.1, p.73-85, 1996.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 2 ed Massachusetts: Publish Sunderland, Editora Sinauer Associades, p.719, 2006.
- TEDERSOO, L.; MAY, T.W.; SMITH, M.E. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. **Mycorrhiza**, v.20, p.217-263, 2010.
- THOMSON, B.D.; GROVE, T.S.; MALAJCZUK, N.; HARDY, G.E.St.J. The effectiveness of ectomycorrhizal fungi to increasing the growth of *Eucalyptus globulus* Labill. in relation to root colonization and hyphal development in soil. **New Phytologist**, v.126, p.517-524, 1994.
- TIBBETT, M.; SANDERS, F.E.; CAIRNEY, J.W.G. The effect of temperature and inorganic phosphorus supply on growth and acid phosphatase production in arctic and temperate strains of ectomycorrhizal *Hebeloma* spp. in axenic culture. **Mycological Research**, v.102, p.129-135, 1998.
- TIMONEN, S.; PETERSON, L. Cytoskeletons in mycorrhizal symbiosis. **Plant and Soil**, v.244, p.199-210, 2002.
- TRESEDER, K.K.; CROSS, A. Global Distributions of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. **Ecosystems**, v.9, p. 305-316, 2006.
- VESK, P.A.; ASHFORD, A.E.; MARKOVINA, A-L.; ALLAWAY, W.G. Apoplasmic barriers and their significance in the exodermis and sheath of *Eucalyptus pilularis* – *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizas. **New Phytol.** v.145, p.333-346, 2000.
- VIEIRA, H.; LIMA, C.; CALZAVARA-SILVA, C.; ACIOLI-SANTOS, B.; MALOSSO, E. The full length PtSRP (*Pisolithus tinctorius* symbiosis related protein) fungal mRNA encodes a potential marker of ectomycorrhiza formation. **American Journal of Molecular Biology**, v.2 p.258-264, 2012.
- VOIBLET, C.; DUPLESSIS, S.; ENCELOT, L.; MARTIN, F. Identifications of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. **The Plant Journal**, v.25, p.181-191, 2001.
- WILCOX, H. E. **Mycorrhizal Associations**. In Biotechnology of Plant-Microbe Interactions. Ed. J P Nakas & C Hagedorn. pp. 227-255. McGraw-Hill, New York, 1990.

- WÖSTEN, H. A. B.; VOCHT, M. L. Hydrophobins, the fungal coat unravelled. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1469, p.79-86, 2000.
- WRIGHT, D. P.; JOHANSSON, T.; LE QUÉRE, A.; SÖRDERSTRÖM, B. TUNLID, A. Spatial patterns of gene expression in the extramatrical mycelium and mycorrhizal roots tips formed by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* in association with birch (*Betula pendula*) seedlings in soil microcosms. **New Phytologist**, v.167, p.579-596, 2005.
- WULLSCHLEGERH, S.D.; REID, C.P.P. Implication of ectomycorrhizal fungi in the cytokinin relations of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). **New Phytologist**, v.116, p.681-688, 1990.
- YUN, W.; HALL, R. Edible ectomycorrhizal mushrooms: challenges and achievements. **Canadian Journal of Botany**, v.82, p.1063-1073, 2004.

CAPÍTULO II

4. The full length *PtSRP* (*Pisolithus tinctorius* symbiosis related protein) fungal mRNA encodes a potential marker of ectomycorrhiza formation

Artigo publicado no periódico American Journal of Molecular Biology, em julho de 2012. doi:10.4236/ajmb.2012.23027 (<http://www.SciRP.org/journal/ajmb/>)

The full length *PtSRP* (*Pisolithus tinctorius* symbiosis related protein) fungal mRNA encodes a potential marker of ectomycorrhiza formation*

Helder Elisio E. Vieira¹, Cláudia E. P. Lima¹, Carlos E. Calzavara-Silva², Bartolomeu Acioli-Santos^{1,3#}, Elaine Malosso¹

¹Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

²Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, Brazil

³Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães—Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Virologia e Terapia Experimental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil
 Email: #bartacioli@cpqam.fiocruz.br

Received 17 February 2012; revised 22 April 2012; accepted 19 May 2012

ABSTRACT

The *Pisolithus tinctorius* symbiosis related protein expressed sequence tag (EST *PtSRP*) was previously identified in the first hours of the interaction between the fungus *Pisolithus tinctorius* and sweet chestnut *Castanea sativa*, and partially characterized as a fungal marker gene of ectomycorrhizal symbiosis formation. We used the 5' rapid amplification of cDNA ends (RACE) to obtain the *PtSRP* mRNA 5' region, and together with our previously reported 3' mRNA region, the full mRNA sequence was assembled by use of bioinformatics tools and deposited to GenBank (Accession: GU733439). The full-length mRNA sequence (636 bp) revealed the locations of the 5' and 3' untranslated regions (UTRs) and contained the Kozak sequence (ccc aag ATG A) in the 5' UTR. The *in silico* translated *PtSRP* open reading frame (ORF) codes for a 127 amino acid protein and contained four putative post-translational modification sites (two N-glycosylation and two phosphorylation). The protein secondary structure is postulated to be composed of one N-terminal hydrophobic transmembrane alpha helix and at least six hydrophilic beta-strands spread across the protein. Sub-cellular localization prediction suggests that the protein is involved in cellular secretory pathway, supported by the presence of a cleavage site motif close to the membrane anchor. The data presented herein indicate the role of *PtSRP* as a fungal membrane secreted protein involved in early stages of ectomycorrhizal formation, with application as a possible marker for nascent ectomycorrhiza fungal development.

*Competing interests: The authors declare that they have no competing interests.

#Corresponding author.

Keywords: Ectomycorrhiza; Symbiosis Related Genes/Proteins; RACE; EST

1. BACKGROUND

The establishment of ectomycorrhiza involves controlled, intense gene expression in both partners that leads to drastic morphological and physiological changes, crucial to the development of mutualism and symbiotic harmony [1-3]. The comparison of protein extracts from mycorrhizal and non-mycorrhizal mycelia in previous studies has shown differences that suggest specific gene activation during the symbiosis process [4-6]. These findings highlighted a new class of biomolecules thought to control the ectomycorrhiza symbiosis process: the ectomycorrhizins [7]. However, recent studies evaluating the fungal transcript pattern during symbiosis formation have demonstrated that mycorrhization also induces changes in the expression of genes normally expressed in free organisms [3,8-10].

Among the ectomycorrhizins, SRAPs (Symbiosis Related Acid Proteins) and hydrophobins are the most investigated and discussed classes of proteins. However, these proteins were generally isolated from fully established mycorrhiza or those developing associations after several days of interaction [8,9]. The identification of new early stage ectomycorrhizal molecules could bring new insight to the molecular and functional understanding of the ectomycorrhiza formation process. The fungal *PtSRP* mRNA (previously called *Pisolithus tinctorius* symbiosis related receptor 1, accession number EL563703) was isolated [3] and partially characterized [11] as a possible fungal membrane protein probably secreted in the first hours of fungus-root interaction. In this paper, we present the full-length *PtSRP* fungal mRNA sequence, supported by sequencing of the 5' region and our pre-

viously reported 3' region, followed by *in silico* characterization of the most probable ORF and its relationship with early stages of ectomycorrhiza.

2. RESULTS

2.1. The Full-Length *PtSRP* mRNA

The 5' RACE technique generated a partial 355 bp fragment corresponding to the 5' portion of *PtSRP* mature mRNA (deposited at NCBI as nucleotide record GU733-439). The complete sequence, assembled by contig construction between the 5' RACE fragment and a 3' previously reported sequence (EL563703, [11]) resulted in a 636 bp sequence (Figure 1). Additionally, a unique 604 bp product was obtained by direct PCR of fungal cDNA samples. The nearly perfect alignment of the 604 bp consensus fragment to the 636 bp contig supported the

reliability of the contig; only two nucleotide differences (291 C/T and 306 A/C, Figure 2) were observed and they were in the putative ORF region, with no changes to the amino acid (synonymous mutations). The *PtSRP* mRNA putative ORF is 384 bp long and codes for a protein of 127 amino acids (a.a.) (Figure 1), with untranslated regions (UTRs) upstream and downstream of the ORF. The Kozak motif sequence (ccc aag ATG A) was present in the 5' UTR, albeit slightly variable from the original Kozak sequence (gcc Rcc AUG G) for three of the nucleotides: -6 (C), -2 (A), -1 (G) and 4 (A) (Figure 1).

2.2. *In Silico* Analysis of *PtSRP*

In silico analysis of *PtSRP* primary structure indicated theoretical molecular weight of 13,969 kDa and an iso-

	484	
1	ACC TCT CTC TCG AAC ACC TCC ACA TCC TTT ACT TAC TAC CCT CCC	45
	3-2-1 +1-2-3 +4	
46	AAG ATG ATG TTC ACG AAG TCT CTC ATG TCC TCA TTC TTC GCT CTC	90
1	← Met Met Phe Thr Lys Ser Leu Met Ser Ser Phe Phe Ala Leu	14
	<hr/>	
91	ATG TCC CTC CTT GCA CTG GCG ATG TCC GTG CCT CTC CAG AAA CGA	135
15	Met Ser Leu Leu Ala Leu Ala Met Ser Val Pro Leu Gln Lys Arg	29
	<hr/>	
136	GAT GTC TTC GTC CCC CCG GTC CTC GAT CCT CAC CAG GGG ACC GTC	180
30	Asp Val Phe Val Pro Pro Val Leu Asp Pro His Gln Gly Thr Val	44
	<hr/>	
181	TGG TAC GTT GGG CAA CAA GCA GAA GTC GTC TGG GAC ACG AGT AAC	225
45	Trp Tyr Val Gly Gln Gln Ala Glu Val Val Trp Asp Thr Ser Asn	59
	<hr/>	
226	GCC CCT GCA CAA ATC ACA AAT TCA GAG GGA CAG ATT TAT CTC GTC	270
60	Ala Pro Ala Gln Ile Thr Asn Ser Glu Gly Gln Ile Tyr Leu Val	74
	<hr/>	
271	GTA AAC AAC CTC ATC GAT TTC GAC TAC TTG TTG GCA AAT GAT TTC	315
75	Val Asn Asn Leu Ile Asp Phe Asp Tyr Leu Leu Ala Asn Asp Phe	89
	<hr/>	
316	AAI ATT CTC GAT GGG AGT GTG ATG GTC ACA GTA CCG GAC GTG CCG	360
90	Asn Ile Leu Asp Gly Ser Val Met Val Thr Val Pro Asp Val Pro	104
	<hr/>	
361	ACT GGC ATT TAT GCC ATC GTC TTG TTT GGT GAT TCT GGT AAC TTT	405
105	Thr Gly Ile Tyr Ala Ile Val Leu Phe Gly Asp Ser Gly Asn Phe	119
	<hr/>	
406	AGC CAG AAC TTC ACC ATC ATA GCG TGA TCC CAT CAC GTC CTT GCA	450
120	Ser Gln Asn Phe Thr Ile Ile Ala End →	127
	<hr/>	
451	ACT TTA TCT CTC TGA ACG ATT TCA TGA ACA ATG ATG AAG GAC TTC	495
	<hr/>	
496	TGT TTC GTT TAC CAC TCA GGA CTT GGT TTC ATA CAT TAG GAC GAC	540
	<hr/>	
541	AAA TAC AAT GCA TCC GGA ACA TTT AGC AAT GGA CTT GTA ACC CCC	585
	<hr/>	
586	TTT CGC ATT CTG CTG TAC GTA TAT GGA CTA GGA TCC GGG ACC ATT	630
	<hr/>	
631	CTA CTA 636	

Figure 1. The *PtSRP* mRNA. Complete nucleotide sequence (636 bp) and its probable ORF (the codons and corresponding 127 amino acids). The ORF represents the largest translation region for the sequence. Stop codon is represented by the word "End". Full line = new fragment obtained by RACE 5'; Interrupted line = 3' previously reported sequence (EL563703, Acioli-Santos *et al.*, 2009); ← = 5' UTR; → = 3' UTR; □ = Kozak sequence with variation and respective base positions.

electric point of 3.92. Further, four targets of post-translational modifications were predicted: two N-glycosylation sites (residues 118 to 121 (NFSQ) and 122 to 125 (NFTI)) and two casein kinase II phosphorylation sites (residues 65 to 68 (TNSE) and 99 to 102 (TVPD), **Figure 3**).

The predicted secondary structure was an N-terminal hydrophobic transmembrane alpha-helix, from residues 10 to 20, followed by six beta-sheets interspersed by short loops (**Figure 3**). A signal peptide cleavage site

was predicted close to the membrane, between the 23rd (serine) and 24th (valine) residues. Sub-cellular localization prediction indicated strong probability that the PtSRP protein is involved in cellular secretory pathway, which is also supported by the presence of the N-terminal signal peptide cleavage site. Hydrophobicity analysis demonstrated that the *PtSRP* initial region is strongly hydrophobic (**Figure 4**) supporting the secondary structure prediction analysis (*i.e.* an initial alpha-helix region).

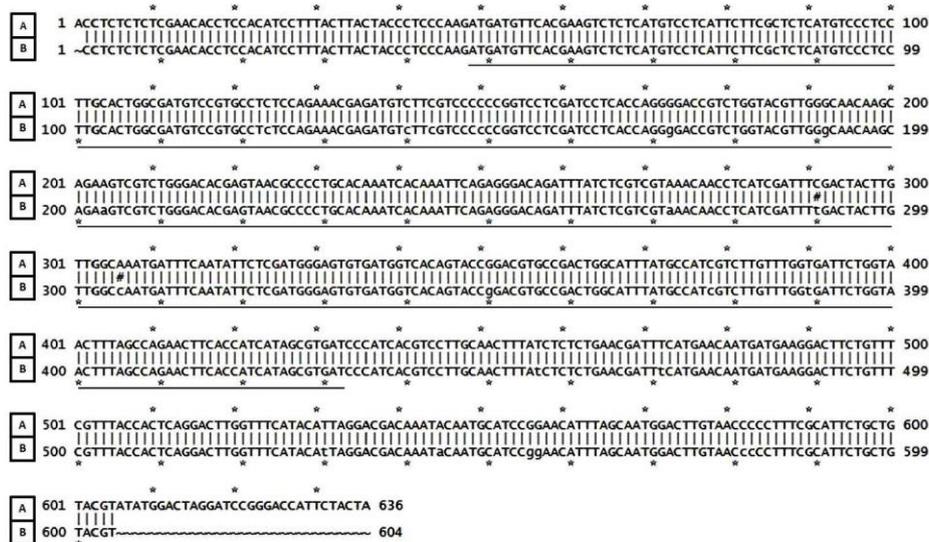


Figure 2. Alignment between the RACE assembly (636 bp; A) and the directly amplified and cloned sequence (604 bp; B) indicating only two nucleotide changes in 291C/T and 306 A/C positions (#). —: *PtSRP* ORF.

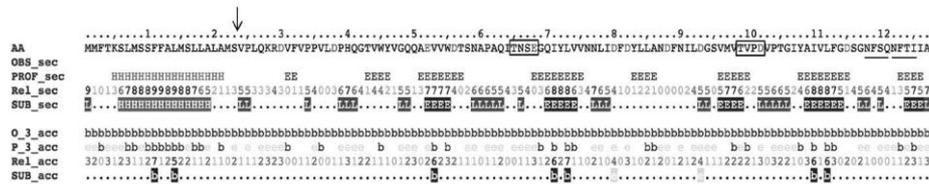


Figure 3. Secondary structure prediction and transmembrane domain of the PtSRP. Legend: AA = amino acid sequence, PHD htm = transmembrane helix prediction (M = transmembrane helix, blank spaces = non-membrane regions), Rel htm = PHD htm prediction reliability index (Reliable predictions are marked “”), PROF sec = secondary structure prediction (H = Helix, E = sheet, blank: “loop”), Rel sec = PROF sec prediction reliability index (0 = low to 9 = high), SUB sec = all PROF sec predictions subset, for all residues with an expected average accuracy > 82% (L = “loop”, “.” = no prediction for the residue), O_3 acc = observed relative solvent accessibility (b = 0% - 9%, i = 9% - 36%, e = 36% - 100%), P_3 acc = predicted relative solvent accessibility, Rel acc: P_3 acc prediction reliability index, SUB acc: P_3 acc prediction subset, for all residues with an average correlation > 0.69. Glycosylation sites NFSQ and NFTI = (-); Phosphorylation sites TNSE and TVPD = (). The cleavage site near to membrane is represented by (↓). Analyses were carried out in <http://www.predictprotein.org>.

GLOBE prediction indicated that *PtSRP* is not a globular protein.

3. DISCUSSION

The studies of unknown ectomycorrhizal genes need to be carried out in several stages, as there are as yet none or few elements for comparison. Hydrophobins are fungal proteins usually found during the early stages of *P. tinctorius*-*E. globulus* interaction [12]. However, its expression is dubious in some cases, and its use as a symbiotic development marker is debatable [9]. SRAP (Symbiosis Related Acid Proteins) genes have been considered as robust ectomycorrhiza development marker after two days of contact [8,9,13]. To the best of our knowledge, there is no report of SRAPs expression during shorter intervals, such as within early hours of mycorrhizal establishment. *PtSRP* QRT-PCR data [11] confirmed the cDNA microarray analysis [3] of its high relative transcription at 12 h of ectomycorrhizal stimulus. Transcription of this gene apparently does not occur until 6 h of contact, suggesting that the period between 6 and 12 h can be crucial for the *PtSRP* expression [11]. The complete *PtSRP* mRNA sequence showed 78% identity with a *Pisolithus microcarpus* sequence (CB010071; [14]) in ectomycorrhizal association with *Eucalyptus globulus*. Further, 78% identity was detected when compared with a fungus cDNA from a four-day-old *Pisolithus tinctorius*-*Eucalyptus globulus* association (BF942-674; [8]).

The Kozak consensus sequence was found in the 5' UTR of the *PtSRP* mRNA. This regulatory element plays an important role during early processes of gene translation [15] through recognition by the ribosome, resulting in higher or lower protein synthesis [16]. Typical Kozak sequences are followed by the start codon and a guanine base, gccRccAUGG, where R is a purine base three positions before the AUG start codon [17]. In *PtSRP* mRNA, a variant Kozak sequence is observed, but these differ-

ences are common, as variation between species [18-20]. In *Saccharomyces cerevisiae*, for example, adenine is commonly observed to precede the initial methionine codon [19].

The computationally translated protein ORF showed significant local sequence alignment with two previously reported proteins. The first (48% identity and 65% similarity) was isolated from the mycelia of the ectomycorrhizal *Laccaria bicolor* (accession XP_001876100.1). This protein is associated with a small-secreted protein (SSP) of unknown function, up regulated in symbiotic tissues [10]. The other homologous protein (45% identity and 61% similarity) was isolated from the non-ectomycorrhizal *Schizophyllum commune* (accession AF335537) and is highly expressed when the mycelium is growing under low nitrogen availability, an important environment aspect to mycorrhizal formation.

The presence of the integrin binding RGD domain (arginine-glycine-aspartic acid) in a protein has been related to cell adhesion [21], a key feature in the initial stages of ectomycorrhiza formation, as has been observed in some SRAPs [13]. The RGD domain and its variants [21] have not been found in the *PtSRP* protein. This, however, is not an isolated event. Other genes from ectomycorrhizal systems do not present this motif (e.g. SC13 and SC25 in [22] and Lbras in [23]), suggesting it is not a critical ectomycorrhizal domain.

The *PtSRP* post-translation modification sites previously indicated [11] were confirmed after obtention of the full-length mRNA. In addition, the prediction of a transmembrane region (composed of an alpha-helix between the 10th and the 20th a.a. residues) in the protein with a probable cleavage site close to the membrane, and an external portion composed of beta-sheets interspersed with loops were observed. These data suggest that the *PtSRP* protein could act as a signalling secreted protein during early stages of symbiosis. Further studies of the *PtSRP* gene and its protein are required to confirm its function as a potential controller/marker of fungal development in ectomycorrhiza symbiosis.

4. MATERIALS AND METHODS

4.1. Biological Material and Culture Conditions

The fungal strain, culturing and ectomycorrhizal induction were done as described in [24]. *P. tinctorius* (isolate 289/Marx from the University of Tübingen) was maintained on modified Melin-Norkrans agar MNM [25]. Liquid cultures were obtained by transferring mycelia discs from solid cultures to 250 ml liquid MNM contained in Erlenmeyer flasks and kept in the dark at 25°C until a dense mycelium was observed. Fungal biomass was washed in sterile water, immediately frozen in liquid

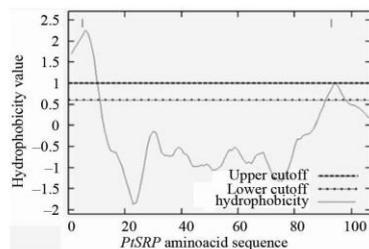


Figure 4. *PtSRP* hydrophobicity analysis. A strong hydrophobic initial region is observed in the protein (Scaled by the Kyte and Doolittle, 1982).

nitrogen and stored at -80°C .

4.2. Synthesis of PtSRP mRNA 5' Portion

Total fungal RNA was extracted using the PureLink™ Micro-to-Midi Total RNA Purification System (Invitrogen). The 5' PtSRP was obtained using 5' RACE technology (GeneRacer—full-length, RNA ligase-mediated rapid amplification of 5' cDNA ends—RLM-RACE, Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The 5' phosphate free ends were linked to GeneRacer™ RNA Oligo and the cDNA was synthesised (Superscript II—Invitrogen). PCR reactions were performed using the primers supplied in the kit, aiming at the GeneRacer™ RNA Oligo combined with gene specific primers targeted to the 3' sequence (PT-1440 REV: 5'-AAATCGTTCAGAGAGATAAAGTTG-3' and PCR 1R REV: 5'-CGTCCGGTACTGTGACCATC-3'). Cloning of the largest RACE fragment was performed using the pGEM-T Easy Vector System (Promega) and the insertion was confirmed by PCR using Promega's specific primers (SP6 and T7) directed to the cloning vector.

4.3. PtSRP 5' Fragment Sequencing and Obtention of Full-Length PtSRP mRNA

Cloned plasmids of recombinant bacteria (TG1) were extracted using Mini-prep. ABI PRISM BigDye™ Terminator V3.1 Cycle sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems) was used for sequencing the 5' RACE fragment in an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer system (Applied Biosystems). Full-length mRNA was obtained by contig formation using SeqMan NGen V1.2 (DNASTAR Lasergene V8.0, Madison-US) after manual edition of sequences using ApE V1.15 (University of California-US) and Chromas Lite V2.01 (Technelysium Pty Ltd., Australia) software. This sequence will be referred in the text as 636 bp.

4.4. PtSRP Cloning and Sequencing

To confirm that the above contig sequence was correctly constructed, a primer pair (PtSRP FW: 5'-CCTCTCTCTCGAACACCTCCAC-3' and PtSRP REV: 5'-ACGTACAGCAGAATGCGAAAAG-3'), directed to the flanking regions of the gene ORF were designed (by use of ApE V1.15) for the direct PCR amplification of the gene from cDNA samples. The amplicons were cloned using the CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas). Cloned plasmids were extracted from recombinant DH10B using QIAprep® spin Miniprep kit and sequenced on an ABI PRISM 3100 as described above. Twelve experimental sequences were aligned giving a 604 bp consensus gene sequence which was further aligned to the 636 bp sequence described above.

4.5. PtSRP mRNA Nucleotide Sequence Analysis and PtSRP Protein Prediction

The most probable ORF definition of the 636 bp was achieved using the "Find ORF" routine in the ApE V1.15, with identification of initial methionine and termination codons. Untranslated regions (UTRs) of possible ORFs were compared to the original Kozak sequence [17]. Additionally, online BLASTx searches [26] were carried out to detect significant similarity between the new ORF and those previously deposited in the NCBI Entrez Protein Database.

Structural analysis of the putative ORF was carried out using the Predict Protein Web-server (<http://www.predictprotein.org>) [27]. Functional databases were searched for conserved domains by use of the InterPro Web-server (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) [28]. The subcellular location prediction of the PtSRP protein was obtained using the TargetP 1.1 Web-server [29] and [30] and potential cleavage site predicted using ChloroP 1.1 [31] and SignalP 3.0 servers [32]. TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) incorporates prediction of cleavage sites and signal/non-signal peptide based on combination of artificial neural networks and hidden Markov models. The following cutoff levels were used: 0.780 for mitochondrial targeting peptide (mTP), 0.000 for secretory pathway signal peptide (SP) and 0.730 for the other features. Further, analyses were performed to study the hydrophobicity (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/MobylyePortal/portal.py?form=toppred>) and globular shape of the protein (<http://www.predictprotein.org>; GLOBE function used). Prediction of a three-dimensional protein model based on homology modelling was not performed due to lack of significant similarity crystallized template structures in RCSB Protein Databank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb>) [33].

5. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brazil) and the Post-Graduation Program on Fungal Biology (PPG-BF, Federal University of Pernambuco—Brazil).

REFERENCES

- [1] Tagu, D., Lapeyrie, F. and Martin, F. (2002) The ectomycorrhizal symbiosis: Genetics and development. *Plant Soil*, **244**, 97-105. doi:10.1023/A:1020235916345
- [2] Le Quere, A., Wright, D.P., Soderstrom, B., Tunlid, A. and Johansson, T. (2005) Global patterns of gene regulation associated with the development of ectomycorrhiza between birch (*Betula pendula* Roth.) and *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **18**, 659-673. doi:10.1094/MPMI-18-0659

- [3] Acioli-Santos, B., Sebastiana, M., Pessoa, F., Sousa, L., Figueiredo, A., Fortes, A.M., Balde, A., Maia, L.C and 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. doi:10.1007/s00284-008-9253-2
- [4] Hilbert, J.L., Costa, G. and Martin, F. (1991) Ectomycorrhizal synthesis and polypeptide changes during the early stage of eucalypt mycorrhiza development. *Plant Physiology*, **97**, 977-984.
- [5] Burgess, T., Laurent, P., Dell, B., Malajczuk, N. and Martin, F. (1995) Effect of fungal-isolate aggressivity on the biosynthesis of symbiosis-related polypeptides in differentiating eucalypt ectomycorrhizas. *Planta*, **195**, 408-417. doi:10.1007/BF00202599
- [6] Martin, F., Duplessis, S., Ditungou, F., Lagrange, H., Voiblet, C. and Lapeyrie, F. (2001) Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: Signal and communication genes. *New Phytologist*, **151**, 145-154. doi:10.1046/j.1469-8137.2001.00169.x
- [7] Hilbert, J.L. and Martin, F. (1988) Regulation of gene expression in ectomycorrhizas. I. Protein changes and the presence of the ectomycorrhiza-specific polypeptides in the *Pisolithus-Eucalyptus* symbiosis. *New Phytologist*, **110**, 339-346. doi:10.1111/j.1469-8137.1988.tb00270.x
- [8] Voiblet, C., Duplessis, S., Encelot, N. and 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. doi:10.1046/j.1365-3113x.2001.00953.x
- [9] Duplessis, S., Courty, P.E., Tagu, D. and Martin, F. (2005) Transcript patterns associated with ectomycorrhiza development in *Eucalyptus globulus* and *Pisolithus microcarpus*. *New Phytologist*, **165**, 599-611. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01248.x
- [10] Martin, F., Aerts, A., Ahren, D., Brun, A., Danchin, E.G., Duchaussoy, F., Gibon, J., Kohler, A., Lindquist, E. and Pereda, V., et al. (2008) The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature*, **452**, 88-92. doi:10.1038/nature06556
- [11] Acioli-Santos, B., Malosso, E., Calzavara-Silva, C.E., Lima, C.E.P., Figueiredo, A., Sebastiana, M. and Pais, M.S. (2009) PtSRR1, a putative *Pisolithus tinctorius* symbiosis related receptor gene is expressed during the first hours of mycorrhizal interaction with *Castanea sativa* roots. *Brazilian Journal of Microbiology*, **40**, 292-295. doi:10.1590/S1517-83822009000200015
- [12] Tagu, D., Nasse, B. and Martin, F. (1996) Cloning and characterization of hydrophobins-encoding cDNAs from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. *Gene*, **168**, 93-97. doi:10.1016/0378-1119(95)00725-3
- [13] Laurent, P., Voiblet, C., Tagu, D., de Carvalho, D., Nehls, U., De Bellis, R., Balestrini, R., Bauw, G., Bonfante, P. and Martin, F. (1999) A novel class of ectomycorrhiza-regulated cell wall polypeptides in *Pisolithus tinctorius*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **12**, 862-871. doi:10.1094/MPMI.1999.12.10.862
- [14] Peter, M., Courty, P., Kohler, A., Delaruelle, C., Martin, D., Tagu, D., Frey-klett, P., Duplessis, S., Chalot, M., Podila, G. et al. (2003) Analysis of expressed sequence tags from the ectomycorrhizal basidiomycetes *Laccaria bicolor* and *Pisolithus microcarpus*. *New Phytologist*, **159**, 117-129. doi:10.1046/j.1469-8137.2003.00796.x
- [15] De Angioletti, M., Lacerda, G., Sabato, V., and Carestia, C. (2004) Beta + 45 G → C: A novel silent beta-thalassaemia mutation, the first in the Kozak sequence. *British Journal of Haematology*, **124**, 224-231. doi:10.1046/j.1365-2141.2003.04754.x
- [16] Kozak, M. (1984) Point mutations close to the AUG initiator codon affect the efficiency of translation of rat preproinsulin *in vivo*. *Nature*, **308**, 241-246. doi:10.1038/308241a0
- [17] Kozak, M. (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Research*, **15**, 8125-8148. doi:10.1093/nar/15.20.8125
- [18] Cavener, D.R. (1987) Comparison of the consensus sequence flanking translational start sites in *Drosophila* and vertebrates. *Nucleic Acids Research*, **15**, 1353-1361. doi:10.1093/nar/15.4.1353
- [19] Hamilton, R., Watanabe, C.K. and de Boer, H.A. (1987) Compilation and comparison of the sequence context around the AUG startcodons in *Saccharomyces cerevisiae* mRNAs. *Nucleic Acids Research*, **15**, 3581-3593. doi:10.1093/nar/15.8.3581
- [20] Lutcke, H.A., Chow, K.C., Mickel, F.S., Moss, K.A., Kern, H.F. and Scheele, G.A. (1987) Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. *EMBO Journal*, **6**, 43-48.
- [21] Ruoslahti, E. (1996) RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **12**, 697-715. doi:10.1146/annurev.cellbio.12.1.697
- [22] Nehls, U., Mikolajewski, S., Ecke, M. and Hampp, R. (1999) Identification and expression analysis of two fungal cDNA regulated by ectomycorrhiza and fruit body formation. *New Phytologist*, **144**, 195-202. doi:10.1046/j.1469-8137.1999.00488.x
- [23] Sundaram, S., Kim, S.J., Suzuki, H., McQuattie, C.J., Hiremah, S.T. and 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. doi:10.1094/MPMI.2001.14.5.618
- [24] Baptista, P., Martins, A., Pais, M.S., Tavares, R.M. and Lino-Neto, T. (2007) Involvement of reactive oxygen species during early stages of ectomycorrhiza establishment between *Castanea sativa* and *Pisolithus tinctorius*. *Mycorrhiza*, **17**, 185-193. doi:10.1007/s00572-006-0091-4
- [25] Marx, D.H. (1969) The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. II. Production, identification, and biological activity of antibiotics produced by *Leucopaxillus cerealis* var. *piceina*. *Phytopathology*, **59**, 411-417.

- [26] McGinnis, S., Madden, T.L. (2004) BLAST: At the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **32**, 20-25.
- [27] Rost, B. and Liu, J. (2003) The Predict Protein server. *Nucleic Acids Research*, **31**, 3300-3304. doi:10.1093/nar/gkg508
- [28] Hunter, S., Apweiler, R., Attwood, T.K., Bairoch, A., Bateman, A., Binns, D., Bork, P., Das, U., Daugherty, L., Duquenne, L. *et al.* (2009) InterPro: The integrative protein signature database. *Nucleic Acids Research*, **37**, 211-215. doi:10.1093/nar/gkn785
- [29] Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. and von Heijne, G. (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology*, **300**, 1005-1016. doi:10.1006/jmbi.2000.3903
- [30] Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. and von Heijne, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering*, **10**, 1-6. doi:10.1093/protein/10.1.1
- [31] Emanuelsson, O., Nielsen, H. and von Heijne, G. (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Science*, **8**, 978-984. doi:10.1110/ps.8.5.978
- [32] Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G. and Brunak, S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology*, **340**, 783-795. doi:10.1016/j.jmb.2004.05.028
- [33] Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. and Bourne, P.E. (2000) The protein data bank. *Nucleic Acids Research*, **28**, 235-242. doi:10.1093/nar/28.1.235

CAPÍTULO III

5. CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA *PtSRP* DO FUNGO ECTOMICORRÍZICO *Pisolithus tinctorius*

Artigo a ser submetido a revista Current Microbiology.

RESUMO

O gene *PtSRP* foi parcialmente caracterizado recentemente nos estádios iniciais da interação ectomicorrízica entre o fungo *Pisolithus tinctorius* e raízes de *Castanea sativa*. As análises *in silico* de sua estrutura secundária revelaram que a proteína putativa *PtSRP* apresentava uma região hidrofóbica inicial transmembranar em alfa-hélice seguida de seis fitas-beta intercaladas por loops. Por sua localização e expressão em fase de pré-infecção, foi sugerido que esta proteína de 127 a.a e 13,969 kDa poderia estar relacionada à sinalização/controla das fases iniciais de formação e desenvolvimento da simbiose. Assim, o objetivo desse trabalho foi clonar a ORF, expressar e purificar a *PtSRP* visando a comprovação de sua expressão em sistema bacteriano e confirmação das análises computacionais anteriores. A abordagem baseou-se na construção prévia do mRNA completo do gene *PtSRP* via RACE 5' onde foi possível identificar *in silico* a sua ORF mais provável. No presente trabalho, esta foi amplificada por PCR com o uso de iniciadores adicionados de sítios de restrição para as enzimas *EcoR1* e *Xho1*. Os fragmentos foram clonados em vetor comercial pJET1.2, Fermentas® e a ORF subclonada em vetor de expressão pET21D(+), previamente tratado com as respectivas enzimas. Essa nova construção foi utilizada para transformar bactérias de expressão BL-21 star. A *PtSRP* foi então expressa em larga escala sob ação do indutor IPTG a 0,1mM e purificada com e sem o uso de ureia. Foram realizadas avaliações por *western blot* através da utilização de anticorpos anti-histidina que reconhecem a cauda de histidina presente na região C-terminal das *PtSRPs* purificadas. O peptídeo traduzido apresentou massa de 16 kDa o que confirmou as análises de predição anteriores bem como sua expressão em micélio de *P. tinctorius* cultivado em condições axênicas. A expressão e purificação da *PtSRP* abriu novas e importantes possibilidades no estudo funcional do gene *PtSRP* especialmente no que se refere à produção de anticorpos visando a realização de estudos de imunolocalização e outras abordagens que ajudem a elucidar o papel da *PtSRP* na simbiose.

Palavras-chave: Expressão gênica, fungos ectomicorrízicos, gene *PtSRP*.

CLONING, EXPRESSION AND PURIFICATION OF PtSRP PROTEIN OF ECTOMYCORRHIZAL FUNGUS *Pisolithus tinctorius*

ABSTRACT

The *PtSRP* gene was recently discovered in the early stages of *Pisolithus tinctorius*-*Castanea sativa* ectomycorrhizal interaction. The secondary structure analyzes revealed that PtSRP had an initial transmembrane hydrophobic region in alpha-helix followed by a six β -sheet interspersed with loops. Its putative protein of 127 aa, molecular weight 13,969 kDa was related with signaling/controlling of early stages of symbiosis development. The aim of this work was to clone the ORF, to express and to purify the PtSRP in order to produce polyclonal antibodies for immunolocalization assays. The approach was based on previous construction of complete PtSRP mRNA by 5' RACE which identified *in silico* its most probably ORF. This was amplified by PCR using primers with restriction sites for EcoR1 and Xho1 enzymes. The PCR fragments were cloned into pJET1.2 commercial vector - Fermentas®, and the ORF subcloned into the pET21D (+) expression vector previously treated with the same enzymes. This new vector construction was used to transform BL-21 star expression bacteria. The PtSRP was then expressed in large scale under inductor action with 0.1 mM IPTG and purified with and without the use of urea. Evaluations were carried out by western blot using anti-histidine antibodies that recognize this histidine tail at the C-terminal of the purified PtSRPs. The translated peptide showed a mass of 16 kDa which confirm the the earlier prediction analyzes. The PtSRP cloning, expression and purification opened new possibilities in the functional PtSRP gene study well as your protein for the early stages of symbiosis formation and development.

Keywords: gene expression, ectomycorrhizal fungi, PtSRR1.

1. INTRODUÇÃO

As ectomicorrizas são um tipo de micorriza no qual o fungo se desenvolve externamente à raiz e nos espaços intercelulares do córtex da planta hospedeira estabelecendo uma relação simbiótica mutualística em que ambos os envolvidos são beneficiados: o fungo recebe carboidratos fotossintetizados e em troca fornece água e nutrientes pouco móveis do solo (PETERSON et al., 2004; SOUZA et al., 2006; SMITH & READ, 2008; BÜCKING et al., 2012).

Estima-se que este tipo de associação ocorra em 90% das árvores em regiões de clima temperado e, em países de clima tropical, como o Brasil, ectomicorrizas já foram descritas em diversas famílias botânicas como Pinaceae (*Pinus* spp.) e Myrtaceae (*Eucalyptus* spp.) com registros predominantes, no sul do país (especialmente em Santa Catarina) e no sudeste de Minas Gerais (CARDOSO et al., 1992).

Devido ao valor econômico das ectomicorrizas, estudos em diversas áreas como bioquímica, genética e biologia molecular têm sido feitos a fim de melhor compreender o mecanismo de simbiose (MENOTTA et al., 2004; LE QUÉRÉ et al., 2005; MARTIN et al., 2008; DUPLESSIS et al., 2005; ACIOLI-SANTOS et al., 2008, 2010; VIEIRA et al., 2012).

O reconhecimento entre o micobionte e o hospedeiro ocorre através da ativação de algumas enzimas e síntese de proteínas fundamentais nos estádios iniciais do desenvolvimento da micorriza (BARKER et al., 1998; BONFANTE-FASOLO & SPANU, 1994; ACIOLI-SANTOS et al., 2010). Dentre as proteínas descritas como potenciais participantes da simbiose estão as ectomicorrizinas (HILBERT et al., 1991), as hidrofobinas (TAGU et al., 2001; DUPLESSIS et al., 2005; LE QUÉRÉ et al., 2004; ACIOLI-SANTOS et al., 2008) e as SRAPs (simbiosis related acid protein) (LAURENT et al., 1999). Estas últimas são consideradas fortes marcadoras do desenvolvimento da associação ectomicorrízica entre *Pisolithus tinctorius* e *Eucalyptus globulus* (DUPLESSIS et al., 2005).

Através de técnicas como os microarranjos de cDNA, no sistema *P. tinctorius* - *Castanea sativa*, Acioli- Santos et al. (2008) identificaram a participação de diversos genes fúngicos de função desconhecida. Um deles (Clone ID: 1440), o gene batizado de *PtSRR1* – *Pisolithus tinctorius* symbiosis related receptor 1 (Hoje chamado de PtSRP), por apresentar uma expressão positiva entre 6-12h quando em indução micorrízica, teve

sua porção 3' parcialmente caracterizada (ACIOLI-SANTOS et al., 2009). Os dados revelaram a possibilidade de este gene estar envolvido no processo de reconhecimento fungo X planta dada a forte possibilidade de ser esta uma proteína transmembranar. Embora houvesse indícios de que este gene estaria relacionado à ectomicorrização, não foi encontrado para o peptídeo traduzido nenhum domínio conservado clássico de proteínas previamente caracterizadas nem de estrutura cristalizada similar em bancos de dados.

Mais recentemente foi obtida a porção 5' restante do gene, através de uma técnica que permite o isolamento de mRNAs completos denominada RACE 5' (Rapid amplification of cDNA ends). Esta nova porção juntamente com a sequência 3' parcial anterior (Access. No. EL563703) deu origem a um novo fragmento de 636 pb correspondente ao mRNA completo do *PtSRP*. Análises preliminares do mensageiro apontaram para uma ORF mais provável que codificava um peptídeo de 127 a.a, peso molecular de 13,969 kDa e uma região inicial hidrofóbica em alfa-hélice transmembranar (VIEIRA et al., 2012).

No presente estudo procurou-se aprofundar as análises bioinformacionais desta construção, de modo a antever seu provável papel na associação. Também focamos na clonagem da ORF mais provável, expressão e purificação da *PtSRP* com vistas à elucidação parcial do seu papel fisiológico no desenvolvimento da simbiose.

2. OBJETIVOS

2.2 Objetivo geral

Construir o gene *PtSRP* em sistema de expressão e expressar a *PtSRP* em sistema procarioto para fins de imunolocalização celular desta proteína no fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*.

2.3 Objetivos específicos

- Construir o gene *PtSRP* com estratégias para expressão em sistema procarioto;
- Clonar a ORF, expressar a proteína em bactérias e purificar a *PtSRP*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico e produção de biomassa para a expressão da PtSRP

Culturas do isolado ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pt-103), fornecidas pelo Unit of Molecular Biology and Plant Biotechnology (ICAT) da Faculdade de Ciências de Lisboa, Universidade de Lisboa-Portugal, foram mantidas em placas de Petri (9cm de diâmetro) contendo cada, 20 mL de meio sólido Melin-Norkrans Modificado - MNM (MARX, 1969) em incubadoras B.O.D. a 25 ± 1 °C, no escuro, por 2 meses. Para manter a viabilidade do micélio e a manutenção da amostra, novos repiques foram feitos a cada dois meses para as mesmas condições citadas anteriormente. Parte do material referente às culturas do fungo ectomicorrízico (placas de Petri contendo meio MNM sólido) foram armazenadas em refrigerador a 4°C por 2 meses e sempre que necessário, um novo repique foi realizado.

Para obtenção de biomassa, discos de micélio (5mm de diâmetro) foram retirados das bordas das colônias crescidas em placas de Petri e repicados para frascos de Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido Melin-Norkrans modificado – MNM (MARX, 1969). Em seguida, os frascos de Erlenmeyer foram postos em B.O.D. a 25 ± 1 °C, no escuro e sem agitação, por 1 mês. Após o crescimento da colônia, desta biomassa foi extraído o RNA total com finalidade da síntese de cDNA. Após um mês de crescimento, a biomassa obtida foi armazenada em Ultrafreezer a – 80°C para a etapa seguinte de extração de DNA/RNA. Essas etapas foram realizadas nas dependências do Departamento de Micologia da UFPE.

3.2 Extração de RNA total do fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*

Com a ajuda de almofariz e pistilo de porcelana, a biomassa fúngica foi macerada com nitrogênio líquido até se transformar em pó. Em seguida, foi extraído o RNA total utilizando o Kit PureLink™ Micro-to-Midi Total RNA Purification System (Invitrogen®), segundo as recomendações do fabricante. Foram adicionados cerca de 100 mg do micélio em pó aos microtubos de 1,5 ml, juntamente com a solução de lise do kit. Em seguida, o micélio foi macerado com micropistilo por aproximadamente 1 min, seguido de agitação em vórtex por 3 min e incubação em temperatura ambiente por 3 min. Posteriormente, a amostra foi macerada novamente por 1 min e centrifugada por

2 min/ 15,700×g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 500 µl de etanol 70%. Por inversão do tubo, a amostra foi gentilmente homogeneizada. Transferiram-se 500 µl para uma coluna de separação (*spin-cartridge*) e fez-se uma centrifugação de 15s/ 15,700×g, sendo o filtrado descartado. Esta etapa foi repetida até que toda a amostra fosse filtrada na mesma coluna. Em seguida, procedeu-se a lavagem da amostra na coluna com a adição de 350 µl do tampão de lavagem I, centrifugação por 15s/ 15,700×g e descarte do filtrado.

Após a lavagem, a amostra foi tratada na coluna com a enzima DNase I 1000u (Fermentas[®] Life Sciences). Para isso, foi preparado um mix contendo 67 µl de água livre de RNase, 8 µl de tampão, 5 µl da enzima para um volume final de 80 µl. O mix foi imediatamente adicionado ao centro da coluna e incubado por 15 min em temperatura ambiente. Em seguida, repetiu-se a lavagem com tampão I por duas vezes. Na segunda lavagem, foram acrescentados 700 µl do tampão de lavagem I à coluna, seguido de uma centrifugação de 25s/ 14,500×g. O filtrado foi descartado. Foram adicionados 500 µl do tampão de lavagem II à coluna e realizou-se uma centrifugação de 25s/ 14,500×g com descarte do filtrado. Esta etapa foi repetida uma vez. Finalmente, foi feita uma centrifugação por 1 min/ 14,500×g para secagem completa da coluna. O tubo coletor foi substituído por um novo tubo (*Recovery tube*) para a eluição do RNA. Nesta etapa, adicionaram-se 50 µl de água livre de RNase ao centro da coluna, incubou-se por 1 min em temperatura ambiente e centrifugou-se por 2 min/ 15,700×g. Ao final do processo, foram obtidos 50 µl do filtrado contendo o RNA total.

3.3 Análise qualitativa e quantificação do RNA

A quantificação do RNA total das amostras foi realizada em espectrofotômetro (Eppendorf[®] Biophotometer), segundo Sambrook et al. (1989). A quantidade foi calculada em µg/µL⁻¹ através da fórmula:

$$[\text{RNA}] = \frac{A_{260} \times Fc \times fd}{1000}$$

onde $A_{260\text{nm}}$ é o valor de leitura da amostra a 260 nm; **Fc** corresponde ao fator de conversão, no qual a A_{260} máxima é 1 e corresponde a 40 µg mL⁻¹ de RNA; **fd** corresponde ao fator de diluição da amostra de leitura; o resultado da multiplicação é dividido por mil para obtenção da concentração em µg µL⁻¹. A qualidade do RNA foi analisada com base na relação da absorbância em 260 e 280 nm, assim como na visualização do RNA, após eletroforese em gel de agarose 1% em TAE 1X livre de

RNAse. A qualidade da extração foi aferida pela observação da proporção (1:2:1) dos valores de absorvância nos comprimentos de onda de 230, 260, 280 nm, respectivamente para verificar a presença de fenóis e ou proteínas, além de outras impurezas na amostra.

3.4 Síntese de cDNA e confirmação do gene *PtSRP* do fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*

A síntese do cDNA a partir do RNA obtido anteriormente foi realizada com uso da enzima transcriptase reversa (SuperScript II - Invitrogen®). Em um microtubo foram adicionados 3µl da amostra de RNA total (Concentração final de 10µg RNA total), 1µl de iniciadores hexameros a 10 mM e 7µl de água DEPC. A amostra foi incubada em banho seco por 10 min. a uma temperatura de 70°C. Em seguida, adicionou-se ao microtubo o volume de 4µl de *First Buffer 5X*, 2µl de dNTP a 10mM, 2µl de DTT a 0.1M e 1µl de enzima *SuperScript II* - Invitrogen®). A reação foi homogeneizada cuidadosamente com a ponteira e transferida para um bloco térmico a 42°C/2h. Em seguida o produto final foi congelado a -20°C.

Para confirmar a presença do mRNA do gene *PtSRP* uma alíquota do cDNA foi utilizado para as reações de PCR. Para estas reações foram utilizados iniciadores gene-específicos direcionados à porção 3' conhecida (ACIOLI-SANTOS, 2006). O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador (Benchtop® UVP-TFM-26).

3.5 Desenho de iniciadores para a amplificação do mRNA do *PtSRP* via PCR

Para confirmar a sequência de 636pb referente ao mRNA completo do gene *PtSRP* foram desenhados iniciadores complementares à região 5' senso e 3' antisenso deste fragmento, com o uso do programa ApE® v1.15, de acordo com as seguintes especificações: temperatura de desnaturação (min. 55°C e máx. 60°C); comprimento do iniciador (20-25 pb); conteúdo de GC (45-60%); GC clamp (min. 1 e máx. 2); bases consecutivas (máx.3). A partir dos dados gerados (**Anexo A**) foi selecionado o par de iniciadores que amplifica o maior fragmento (*amplicon* esperado de 604pb). O iniciador senso foi denominado de *PtSRP* FW: 5'- CCTCTCTCTCGAACACCTCCAC -3' e o anti-senso de *PtSRP* REV: 5'- ACGTACAGCAGAATGCGAAAG -3'.

3.6 PCR de amplificação do *PtSRP* completo via PCR

As reações de PCR foram preparadas em quadruplicata conforme o protocolo a seguir: 1µl do produto da transcrição reversa (Item 3.4), 5µl de PCR Buffer Taq DNA Polymerase 10X, 2µl de MgCl₂ a 50mM, 2µl de dNTPs a 10 mM, 2µl do iniciador senso *PtSRP* a 10mM, 2µl do iniciador *PtSRP* anti-senso a 10mM, 1µl de Taq DNA Polymerase, 35,5 µl de água ultrapura. A reação foi posta em termociclador seguindo o programa: Desnaturação inicial a 94°C por 3min; 30 ciclos de 94°C por 30s, 50°C por 30 s, 72°C por 1 min; extensão final de 72°C por 10 min. Uma alíquota de cada produto de PCR foi submetida a eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA), sob voltagem de 90V por 45 min em tampão TAE 1X. O gel foi observado em transluminador e o resultado foi fotodocumentado. O produto de PCR remanescente foi purificado com o uso do kit PCR Clean-up Gel Extraction - Macherey-Nagel™, segundo recomendações do fabricante e armazenado a -20°C para uso posterior.

3.7 Clonagem do amplicon de 604pb correspondente ao mRNA do gene *PtSRP*

A clonagem do fragmento esperado de 604pb foi realizada utilizando o kit pGEM®-T Easy Vector System (Promega®). Os vetores pGEM®-T Easy Vectors possuem extremidades livres (3'Timina) que promovem ligação eficiente aos produtos de PCR gerados pela atividade de certas polimerases termoestáveis, que adicionam ao final do fragmento amplificado uma deoxiadenosina. Os passos para clonagem foram: adenilação, ligação e transformação. Na etapa de adenilação foram utilizados: 5 µl do produto PCR, 1 µl do tampão de PCR 10X, 0,3µl de MgCl₂ a 50mM, 0,2µl de dATP's a 100mM, 1 µl de enzima Taq DNA Polimerase, 2,5µl de água ultrapura, para um volume final de 10µl. Em seguida, a amostra foi posta em bloco térmico a 72°C/20 min. Na reação de ligação foram utilizados: 2 µl do produto de adenilação, 5 µl de tampão 2X, 0,5 µl de Vetor pGEM-T, 1 µl de T4 DNA ligase, 1,5 µl de água ultrapura para um volume final de 10µl. A amostra foi incubada de um dia para o outro. Para a seleção dos transformantes foi preparada uma placa de LB enriquecida com ampicilina 50 µg/µl com 100 µl de IPTG a 100 mM e 20µl de X-Gal a 50 mg/ml. Em um microtubo de 1,5 mL foram adicionados 5 µl da reação de ligação e 50 µl de células competentes DH10B.

Em seguida, a amostra foi incubada no gelo por 20 min e levada ao banho-maria (42°C) por 50 s para novamente permanecer em gelo por 2 min. Foi adicionado à amostra um volume de 950 µl do meio LB. A amostra foi incubada a 37°C por 1 h e 30 min em agitador orbital. Cerca de 250 µl desta amostra foram distribuídos na placa LB+AMP 50 µg/µl, IPTG 100 mM, X-GAL 50 mg/ml. A placa foi incubada em estufa a 37°C de um dia para o outro para a visualização das colônias brancas recombinantes.

3.8 Confirmação da clonagem do fragmento de 604pb e sequenciamento dos clones positivos

Colônias brancas recombinantes (Item 3.7) foram inoculadas em 3ml de meio de cultura LB adicionado de ampicilina 50mg/ml e deixadas da noite para o dia a 37°C a 150 rpm em incubadora. Em seguida foi realizada a extração de DNA plasmidial em pequena escala para extração dos plasmídeos recombinantes com o uso do kit GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit, Fermentas (#k0502, #K0503) segundo recomendações do fabricante.

Para confirmar a clonagem, uma alíquota de 1µl foi utilizada nas reações de PCR, com iniciadores específicos (T7 e SP6) para as regiões que flanqueiam o sítio de clonagem do vetor pGEM®-T Easy Vector.

O produto do miniprep restante foi sequenciado com o uso do Kit comercial ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v 3.1 Ready Reaction (Applied Biosystems®), de acordo com as recomendações do fabricante. Os produtos das reações foram analisados em sequenciador ABI® PRISM 3100 Genetic Analyzer, (Applied Biosystems) no núcleo de plataforma tecnológicas da Fiocruz PE.

3.9 Edição e alinhamento da sequencia obtida via PCR com a construída via RACE 5'

Os cromatogramas foram analisados e editados manualmente para a retirada das regiões do vetor com o uso do softwar ApE® v1.15. Em seguida foram gerados *contigs* com as sequências já editadas (senso e anti-senso), de cada clone, com o uso do Chromas Lite® v 2.01. Após a construção dos *contigs* foi gerado uma sequência consenso final (softwar SeqMan® NGen v1.2.) que por fim, foi alinhada com a sequencia de 636pb descrita anteriormente com o objetivo de verificar a presença de

possíveis polimorfismos e pontos de erros gerados pelo processo de sequenciamento (BioEdit® v7.0.5). Adicionalmente foi feita a busca no NCBI utilizando a ferramenta *online* BLASTx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para observação de similaridade significativa com sequências previamente depositadas.

3.10 Tradução *in silico* e comparação da ORF do gene *PtSRP* via RACE 5' com o fragmento obtido por PCR

A escolha da ORF mais provável foi realizada através da ferramenta de “busca de ORF” contida no programa ApE® v1.15. Em seguida a sequência foi editada, deixando-se apenas a região codificante. Esta foi traduzida *in silico* com o uso da ferramenta *Translate* do mesmo programa e em seguida esta foi comparada com sequência do peptídeo traduzido da ORF mais provável da sequência de 636pb correspondente ao mRNA completo do gene *PtSRP*.

3.11 Desenho de iniciadores com sítios de restrição (enzimas *EcoR1* e *Xho1*) para a amplificação da ORF do *PtSRP*

Para a amplificação do *PtSRP* completo e futura clonagem em vetor de expressão foi necessário o desenho de iniciadores adicionados de sítios de restrição. Com o uso do programa ApE® v1.15 foram desenhados iniciadores que se anelam à região 5' senso e 3' anti-senso da ORF, de acordo com as seguintes especificações: Temperatura de desnaturação (~ 70°C); comprimento do iniciador (30-40 pb); conteúdo de GC (45-60%). Foram adicionados aos iniciadores senso e anti-senso os sítios de restrição para as enzimas *EcoR1* e *Xho1*, respectivamente. Ao início de cada iniciador (sentido senso) foram adicionadas quatro bases para a ancoragem das enzimas de restrição. Em seguida, as seqüências foram enviadas para síntese na Empresa Bioneer Oligo Synthesis Report.

3.12 PCR de amplificação da ORF do Gene *PtSRP* completo com sítios de restrição (enzimas *EcoR1* e *Xho1*)

Da amostra de cDNA (Item 3.4.), foi realizada a reação de PCR, nas seguintes condições: 1µl do produto da transcrição reversa, 5µl de PCR Buffer High Fidelity 10X, 2µl de MgCl₂ a 50mM, 2µl de dNTP a 10 mM, 2µl do iniciador PtSRP senso com sítios para a EcoRI a 10mM, 2µl do iniciador PtSRP anti-senso com sítios para a XhoI a 10mM, 0,5µl de Taq High Fidelity, 35,5 µl de água ultrapura. A reação foi posta em termociclador seguindo o programa: Desnaturação inicial a 96°C por 3min; 30 ciclos de 94°C por 30s, 65°C por 30 s, 72°C por 2 min; extensão final de 72°C por 10 min. Uma alíquota de cada produto de PCR foi submetida a eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA). A corrida foi realizada sob voltagem de 90V por 45 min em tampão TAE 1X. Em seguida o gel foi observado em transiluminador e o resultado foi fotodocumentado

Em seguida o produto de PCR foi purificado com o uso do kit PCR Clean-up Gel Extraction - Macherey-Nagel™, segundo recomendações do fabricante e armazenado a -20°C para uso posterior.

3.13 Clonagem da ORF do Gene *PtSRP* completo com sítios de restrição EcoRI e Xho1, em vetor pJET1.2 Fermentas®

A clonagem do produto de PCR (Item 3.12) foi realizada utilizando-se o kit Fermentas® – Clonejet PCR cloning kit #k1231, #k1232 - Sticky-end cloning protocol, de acordo com as recomendações do fabricante. Em microtubo de 1,5 ml foram adicionados 10µl do produto de PCR (concentração final 100ng/µl), 1µl de tampão de reação a 2X, 6µl de água livre de nucleases, 1µl de enzima de corte do DNA (*DNA blunting end*).

A amostra foi homogeneizada, centrifugada rapidamente de 3-5 s e incubada a uma temperatura de 70°C por 5 minutos e, em seguida posta em gelo. A reação de ligação foi preparada adicionando-se ao microtubo 1µl do pJET 1.2/blunt cloning vector (50 ng/µl) e 1µl de T4 DNA ligase (5u/µl). Novamente a amostra foi homogeneizada, centrifugada de 3-5s e incubada em temperatura ambiente por 30 minutos. Na etapa da transformação bacteriana, foram utilizados 5µl da reação de ligação, 25 µl de tampão de transformação (5mM MgCl₂, 5mM Tris-HCl pH7.4) e 50µl de células quimiocompetentes por choque térmico (linhagem NEB5α).

A reação foi incubada por 30 minutos no gelo, 5 minutos a 37°C em banho-maria e devolvida ao gelo por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 1ml de meio líquido

SOC e em seguida reação seguiu para incubadora orbital a 37°C/ 250 rpm/ por 1h. O tubo foi, então, centrifugado 5 min./ 4,200×g e 800µl do sobrenadante foram descartados. O restante foi ressuscitado e semeado em placas de Petri contendo meio de cultura LB, enriquecidos com ampicilina a 50ng/ml. As placas foram crescidas durante a noite em estufa a 37°C para a obtenção das colônias recombinantes.

3.14 PCR de confirmação da clonagem em vetor pJET 1.2 – Fermentas® e miniprep

Um dia após o semeio, foi realizada a seleção clones baseados em critérios como tamanho das colônias e ausência de colônias satélites. As colônias selecionadas repicadas para novas placas de Petri contendo meio de cultura LB, enriquecidos com ampicilina a 50ng/ml a fim de se obter colônias puras. As placas foram crescidas durante a noite em estufa a 37°C e, no dia seguinte, as colônias foram repicadas para 4 ml de meio líquido LB adicionados de ampicilina a 50 ng/ml e incubadas a 37°C a 150 rpm por 16 horas. Uma alíquota de 1 ml da cultura de cada clone foi centrifugada por 5 min./4,200×g, ressuscitado em meio líquido LB + 20% Glicerol e congelada a -80°C. Adicionalmente, foi utilizado 1µl da cultura de cada clone para a realização de PCR a fim de confirmar a clonagem. Os reagentes foram descongelados, homogeneizados por vórtex e em seguida adicionados a microtubos na ordem a seguir: 1µl da amostra (meio LB+Amp + NEB5α), 2µl do tampão da enzima Taq 10X, 1µl de MgCl₂ a 50mM, 1µl de dNTP a 10 mM, 1µl de iniciador PtSRP senso (EcoRI) a 10mM, 1µl de iniciador PtSRP anti-senso (XhoI) a 10mM, 1µl de enzima Taq DNA polimerase e 12µl de água ultrapura. Em seguida as reações foram postas em termociclador seguindo o programa: desnaturação inicial a 96°C por 5min; 30 ciclos de 94°C por 30 seg, 65°C por 30 seg, 72°C por 1 min; extensão final a 72°C por 10 min. O produto de PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 100V por 50 min, com a corrida em tampão TAE 1%. Em seguida o gel foi observado em transiluminador e fotodocumentado.

Os 2.999 ml restantes de cada clone foram centrifugados por 5 min/ 4,200×g e o sobrenadante descartado. O sedimento bacteriano de cada clone foi congelado a -20°C para ser utilizado posteriormente na extração de DNA plasmidial.

3.15 Extrações do DNA plasmidial dos clones positivos

A extração dos plasmídeos recombinantes foi realizada com o uso do Kit GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit, Fermentas (#k0502, #K0503) de acordo com as orientações do fabricante. O sedimento bacteriano, de cada clone (Item 3.13), foi resuspenso em 250µl de *Resuspension Solution* com o uso da pipeta. Cada amostra foi transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Foram adicionados 250µl de *Lysis Solution* e homogeneizado completamente pela inversão do tubo de 4-6 vezes até a solução começar a ficar viscosa e levemente clara por máximos 5 min. Foram adicionados 350µl de *Neutralization Solution* e imediatamente a amostra foi homogeneizada completamente por inversão do tubo de 4-6 vezes. A amostra foi centrifugada por 5 min./ 15,700×g para sedimentar os restos celulares e o DNA cromossômico. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para a *GeneJET™ spin column* por pipetagem. A amostra, então, foi centrifugada por 1 min./ 15,700×g e o filtrado foi descartado. Foram adicionados 500µl de *Wash Solution* à *GeneJET™ spin column* seguida de centrifugação de 30-60s/ 15,700×g. Novamente, o filtrado foi descartado e o procedimento de lavagem foi repetido. O filtrado foi descartado. Para remover resíduos da *Wash Solution* a amostra foi centrifugada por um tempo adicional de 1 min./ 15,700×g. Em seguida, a *GeneJET™ spin column* foi transferida para um novo tubo de 1.5 ml. Foram adicionados 50µl de *Elution Buffer* ao centro da membrana da *GeneJET™ spin column* para eluir o DNA plasmidial. A amostra foi incubada por 2 min a temperatura ambiente e centrifugada por 2 min./ 15,700×g. Em seguida, as eluições foram armazenadas a – 20°C para serem utilizadas nas etapas posteriores.

3.16 Sequenciamento dos clones positivos de 1-10

Com o objetivo de identificar a fidelidade da sequência da ORF do *PtSRP* completo foi realizado o sequenciamento dos clones (Item 3.13), com o uso dos iniciadores senso e anti-senso incluídos no GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit, Fermentas (#k0502, #K0503). Uma alíquota de cada clone foi submetido ao sequenciamento automático utilizando-se o Kit comercial ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v 3.1 Ready Reaction (Applied Biosystems®), de acordo com as recomendações do fabricante conforme descrito anteriormente (Item 3.8).

3.17 Digestão dupla dos clones positivos para a retirada do inserto e subclonagem em vetor de expressão pET21D(+)

Antes da expressão do peptídeo PtSRP foi necessário a realização de uma subclonagem ORF do Gene *PtSRP* em vetor de expressão. Para isso o clone 04 foi selecionado após confirmação de sua sequência de 401 pb (Item 3.16). Foi realizada a retirada do fragmento por digestão dupla conforme protocolo a seguir: 10µl do produto de miniprep a 2,5 µg/µl, 5µl de tampão NEB EcoR1 + BSA 1%, 2µl de enzima EcoR1, 2µl de enzima Xho1, 31µl de água ultrapura. As reações foram incubadas a 37°C por 6 horas. Em seguida, as enzimas foram inativadas a 65°C por 20 minutos. Após esse período, as reações foram posta em gelo e, em seguida, todo o produto da digestão foi submetido a eletroforese em gel de Agarose 100V por 50 min, com a corrida em tampão TAE 1%. O gel foi observado em transluminador e fotodocumentado.

3.18 Purificação do inserto de 401pb a partir do gel de agarose

A purificação do inserto foi realizada com uso do kit PCR Clean-up Gel Extraction, Macherey-Nagel™, de acordo com recomendações do fabricante. A banda de 401pb correspondente a ORF do gene *PtSRP* foi cortada do gel, com uso de uma lâmina estéril, e em seguida, colocada em um microtubo para pesagem. Foram adicionados 200 µl de tampão NT e a amostra foi posta em banho maria por 10 minutos. Em seguida, o microtubo foi transferido para a *NucleoSpin® Extract II Column* acoplada a um microtubo de 2 ml. A amostra foi centrifugada por 1 min. a 11,000×g. O filtrado foi descartado e a *NucleoSpin® Extract II Column* foi recolocada no microtubo de 2 ml. Foram adicionados 700 µl de tampão NT3 à *NucleoSpin® Extract II Column* para a lavagem da membrana de sílica. A reação foi centrifugada por 1 min. a 11,000×g e o filtrado foi descartado. A *NucleoSpin® Extract II Column* foi centrifugada por mais 1 min. a 11,000×g para a remoção de todo o etanol e secagem da membrana de sílica. Nesta etapa a *NucleoSpin® Extract II Column* foi transferida para um novo microtubo. Foram adicionados 50 µl de tampão EM ao centro da coluna e a amostra foi posta em temperatura ambiente por um minuto. Em seguida, a amostra foi centrifugada por 1 min. a 11,000×g. O filtrado permaneceu congelado a -20°C até que a digestão do vetor PET21D(+) estivesse finalizada.

3.19 Digestão do vetor pET21D(+) com as enzimas EcoR1 e Xho1

Para que houvesse a clonagem de expressão da ORF do *PtSRP*, o vetor pET21D(+) precisou ser digerido com as enzimas de restrição compatíveis com as utilizadas na preparação do inserto. Com isto foi realizada a digestão serial deste vetor inicialmente com a enzima EcoR1 e em seguida a enzima Xho1. A escolha da digestão em duas etapas se deu pelo fato de o vetor possuir os sítios de restrição para as enzimas EcoR1 e Xho1 muito próximos uns dos outros e isso poderia acarretar na não digestão do mesmo já que as enzimas não teria espaço físico para realizarem o corte no seu sítio de reconhecimento ao mesmo tempo. Portanto, foram adicionados a um microtubo a quantidade de 2µl do produto da maxpreparação com 3224 ng/µl do vetor, 5µl de tampão NEB EcoR1 + BSA 1%, 2µl de enzima EcoR1, 41µl de água ultrapura. A reação foi posta em banho seco a 37°C por 6h (Temperatura de corte da enzima), a 65°C por 20 min (inativação da enzima) e em gelo, seguindo-se de precipitação. Nesta fase adicionou-se ao microtubo de 1,5 ml um volume de 150µl de água ultrapura (Ultrapura DNase RNase free). A reação foi homogeneizada cuidadosamente com o uso da pipeta e em seguida foi transferida para um novo microtubo de 1,5 ml. Foram adicionados 12µl de 5M de NaCl e a reação foi misturada com a ajuda do agitador de tubos brevemente. Foram adicionados 500µl de etanol a 100% e novamente a amostra foi vortexada. Na sequência, o tubo foi incubado por 30 min. a uma temperatura de -80°C em ultrafreezer. Após esse período o material foi centrifugado por 10 min/ 16,100×g, o sobrenadante foi descartado e o sedimento liofilizado por 10 minutos no concentrador à vácuo de amostras. Finalmente o DNA foi resuspendido em 40µl de água ultrapura.

Para a segunda digestão, adicionou-se ao microtubo a quantidade de 5µl do tampão NEB4+BSA1% e 2µl de enzima Xho1. Novamente, a reação foi posta em banho seco a uma temperatura de 37°C por 6h (Temperatura de corte da enzima), a 65°C por 20 min (inativação da enzima) e em gelo por 5 min. Uma alíquota desta digestão foi submetida à eletroforese em gel de Agarose 100V por 50 min, com a corrida em tampão TAE 1%. O gel foi observado em transiluminador e fotodocumentado.

Em seguida realizou-se a purificação do vetor com uso do kit PCR Clean-up Gel Extraction, Macherey-Nagel TM, de acordo com recomendações do fabricante (Item 3.18). O filtrado foi então utilizado para a etapa de ligação descrita a seguir.

3.20 Ligação do *PtSRP* ao Vetor pET21D(+) e transformação em células quimiocompetentes DH10B

Para a reação de ligação (clonagem) foram utilizadas 3 concentrações do inserto a fim de testar a eficiência da ligação (**Tabela 1**). Os reagentes foram adicionados começando pela água e por último a enzima. Esta última permaneceu no gelo e só foi retirada do freezer na hora de ser utilizada. Em seguida as reações foram postas em banho seco de acordo com o programa a seguir: 16°C por 19h30m (temperatura de ligação da enzima); 65°C por 20 min (inativação da enzima) e 4°C por tempo indeterminado.

Tabela 1. Reação de ligação do *PtSRP* ao vetor pET21D(+)

Reagentes:	Tubo 1 Vol. (µl)	Tubo 2 Vol. (µl)	Tubo 3 Vol. (µl)	Controle – Vol. (µl)
Vetor pET21D(+) (20,2 ng/µl)	1,5	1,5	1,5	1,5
10X Buffer T4 DNA ligase 10mM ATP	2	2	2	2
T4 DNA ligase 400,000 U/ml	1	1	1	1
<i>PtSRP</i> 401pb Ecor1/Xho1 (9,3ng/µl)	1	3	5	-
Água Mili-Q	14,5	12,5	10,5	15,5
Vol. final	20	20	20	20

Em seguida as reações de ligação do *PtSRP* no vetor de expressão pET21D(+) foram utilizadas para transformar células quimiocompetentes de *E.coli* da cepa DH10B, Invitrogen®. As reações de transformação foram preparadas conforme protocolo descrito na **Tabela 2**. As reações foram incubadas por 30 minutos no gelo, transferidas para banho-maria por 5 min. a 37°C, e devolvidas ao gelo. Foi adicionado 1ml do meio SOC e em seguida as amostras foram incubadas a 200 rpm por 2 horas a 37°C. Os tubos foram centrifugados por 5 min/ 4,200×g e 800µl do sobrenadante foi descartado. O restante foi ressuspendido e plaqueado em meio LB com ampicilina. As placas foram deixadas da noite para o dia em incubadora a 37°C. No dia seguinte, foram observadas colônias recombinantes. Estas colônias foram repicadas para nova placa de Petri contendo meio de cultura LB com ampicilina e incubadas durante a noite a 37°C.

Tabela 2. Reação de transformação da células DH10B com vetor pET21D(+)

Reagentes:	Tubo 1 Vol. (µl)	Tubo 2 Vol. (µl)	Tubo 3 Vol. (µl)	Controle – Vol. (µl)
Produto da ligação	10	10	10	-
PUC 50pg/µl	-	-	-	10
Tampão (5mM MgCl ₂ , 5mM Tris-HCl - pH7.4)	25	25	25	25
Células competentes <i>E. coli</i> DH10B	50	50	50	50
Vol. final	85	85	85	85

As colônias foram, então, repicadas para Tubos cônicos de 15 ml contendo 4 ml de meio LB + ampicilina numa concentração de 50 ng/ml e colocados em agitador orbital por 16 horas/150rpm. Uma alíquota foi retirada para confirmação da clonagem por PCR e a quantidade remanescente foi centrifugada. O sedimentado bacteriano foi ressuspendido em LB glicerol 50% e congelado a -80°C para as etapas seguintes.

3.21 PCR colônia para confirmação da Clonagem e transformação em DH10B

Para confirmação da clonagem em DH10B foram feitas reações de PCR a partir dos clones crescidos em meio LB líquido (Item 3.20). Em tubos de microcentrífuga foram adicionados 1µl da amostra composta de meio LB líquido com ampicilina a 50ng/ml, 2µl do tampão da Taq 10X, 1µl de MgCl₂ a 50mM, 1µl de dNTP a 10 mM, 1µl de do iniciador PtSRP senso (EcoRI) a 10mM, 1µl do iniciador PtSRP anti-senso (XhoI) a 10mM, 1 µl de enzima Taq DNA polimerase e por fim 12µl de água ultrapura. As reações foram postas em termociclador seguindo o programa: desnaturação inicial a 96°C por 5min; 30 ciclos de 94°C por 30 seg, 65°C por 30 seg, 72°C por 1 min; extensão final a 72°C por 10 min. O produto foi submetido a eletroforese em gel de agarose 100V por 50 min, com a corrida em tampão TAE 1%. Em seguida o gel foi observado em transiluminador e fotodocumentado.

3.22 Transformação em célula quimiocompetente BI-21 Star

A fim de garantir a expressão da proteína de fusão PtSRP sob ação do indutor, o plasmídeo pET21D(+) contendo a ORF do Gene *PtSRP* foi então utilizado para transformar bactérias de expressão BI-21 Star. As reações de transformação foram realizadas conforme protocolo na **Tabela 3** abaixo:

Tabela 3. Reação de transformação de célula BI-21 Star com o vetor pET21D(+)

Reagentes:	Tubo 1 Vol. (µl)	Tubo 2 Vol. (µl)	Tubo 3 Vol. (µl)	Controle – Vol. (µl)
Produto do Vetor pET21D(+)	10	10	10	-
PUC 50pg/µl	-	-	-	10
Tampão (5mM MgCl ₂ , 5mM Tris-HCl - pH7.4)	25	25	25	25
Células competentes <i>E. coli</i> BI-21	50	50	50	50

Em seguida os tubos foram incubados por 30 minutos no gelo, transferidos para banho-maria por 5 min. a 37°C, e devolvidos ao gelo. Foi adicionado 1ml do meio SOC e em seguida as amostras foram incubadas a 200rpm/2 horas a 37°C. Os tubos foram centrifugados a 3500rpm/5 min. e 800µl do sobrenadante foi descartado. O restante foi ressuspensionado e plaqueado em meio LB com ampicilina e as placas incubadas a 37°C. No dia seguinte as colônias recombinantes foram repicadas para nova placa de Petri contendo meio de cultura LB com ampicilina e incubadas durante a noite a 37°C. As colônias selecionadas foram guardadas para serem utilizadas na indução em pequena escala, a fim de se obter a melhor cepa para a expressão em larga escala da PtSRP.

3.23 Mini-indução de síntese proteica da PtSRP em *E. coli*

Em um tubo cônico de 50 ml foi preparado um pré-inóculo de 2 ml de meio LB adicionado de ampicilina a 100µg/ml para o clone 2 da cepa Bl-21, a partir de uma colônia de cultura recém semeada em placa de cultura congelada em glicerol). O tubo foi deixado durante a noite em agitador orbital a 37°C/ 200 rpm. Foi retirado um volume de 100µl deste pré-inóculo e despejado em 2ml de LB adicionado de ampicilina a 100µg/ml, seguindo de incubação a 37°C/ 200 rpm até a cultura atingir uma O.D. de 0,5 (fase log). A O.D. foi medida após 1 hora de incubação no comprimento de onda de 600 nm e, em seguida, foi adicionado o IPTG a uma concentração final de 0,5mM. O frasco contendo o meio de cultura foi incubado por 4 horas a 30°C/ 200 rpm.

3.24 Western blot e detecção da PtSRP por quimioluminescência

A quimioluminescência consiste em um anticorpo secundário conjugado à enzima peroxidase (**Figura 1 d, e**) que, por sua vez, degrada um substrato quimioluminescente (catalisa a oxidação do luminol) (**Figura 1S**), emitindo luz (**Figura 1f**).

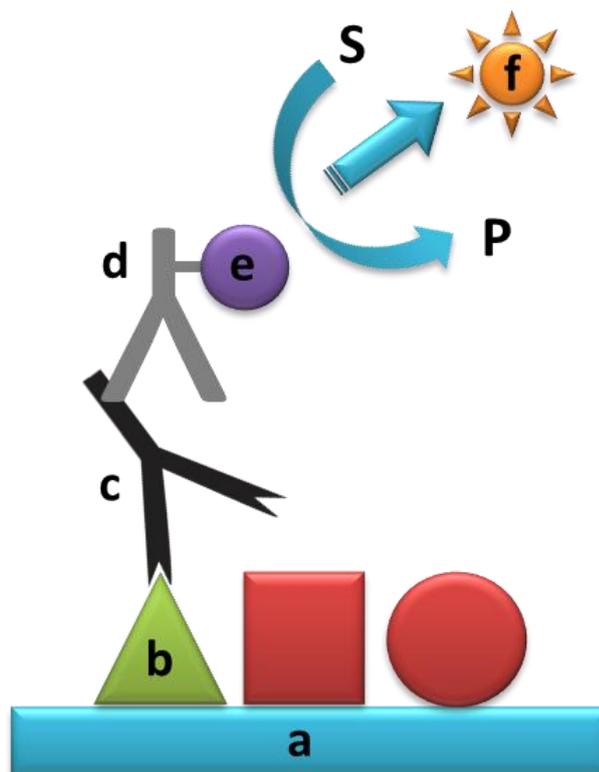


Figura 1. Esquema da detecção enzimática por ação da peroxidase da Proteína PtSRP ligada à membrana. **a.** membrana de nitrocelulose; **b.** proteína PtSRP; **c.** Anticorpo primário anti-PtSRP com cauda de histidina; **d.** Anticorpo secundário anti-histidina associado a enzima peroxidase; **e.** enzima peroxidase; **S.** Substrato ECL; **P.** Produto da reação; **f.** emissão de luz (modificado de Clarity™ Western ECL Substrate - Instruction Manual de, Biorad)

Inicialmente foi realizada a transferência do gel de SDS-PAGE para a membrana de PVDF. O gel foi colocado em 80 ml de tampão de transferência + 20 ml de metanol por 5 min. e enquanto isso, a membrana foi mantida por 5 min. em metanol. Em seguida, o papel absorvente e a membrana foram molhados na solução de metanol e tampão de transferência por aproximadamente 1 min. No transferidor foi feito um sanduíche, de baixo para cima, nesta ordem: papel absorvente, membrana, gel e papel absorvente. Com um rolo foi retirado todo o ar entre as membranas e a voltagem foi ajustada para 25 V por 30 min.

Após a transferência a membrana (Veja o esquema na **Figura 1 a**) foi incubada em agitação por 2h em PBS Tween 0.05% com 5% de leite desnatado (bloqueador). O bloqueador foi desprezado por inversão do recipiente e em seguida a membrana foi incubada em agitação por 1h a TA com o anticorpo primário anti-histidina (Penta-His Antibody Mouse monoclonal, diluição de 1:5.000) direcionado a parte final C-terminal

da proteína. Isso porque na estratégia da clonagem da PtSRP foi adicionada a ORF, uma sequência que codifica para seis histidinas no momento da tradução *in vitro* permitindo que o anticorpo primário pudesse reconhecer a PtSRP.

No seguimento, foram realizadas 3 lavagens de 10 min., cada uma (sob agitação), utilizando PBS Tween 0,05%. A membrana foi incubada com o anticorpo secundário associado a peroxidase numa diluição de 1:10.000, por 1 hora a TA, ou seja, 1µl do anticorpo em 10ml de PBS Tween 0,05% + leite a 1%. Novamente foram realizadas 3 lavagens de 10 min., cada uma, (sob agitação) utilizando PBS Tween 0,05%. Em seguida foi adicionado o substrato ECL (1,5ml S1 + 1,5ml S2) com o uso de uma pipeta Pasteur descartável, na qual todo o líquido foi colocado sobre a membrana até cobri-la completamente (Kit Clarity™ Western ECL Substrate, Biorad). Passado 1 min, todo o excesso do líquido foi removido e a membrana foi exposta ao filme fotográfico para a captação da luz da reação em duas partes: a primeira foi exposta por 2 min. e a segunda por 10 min. Para a revelação foi utilizado o kit revelador da KODAK®: 3 min. mergulhado no Dektol por 3 min.; no interruptor por 3 min. e 3 min. do fixador. Imediatamente o filme foi lavado em água e posto para secar em TA.

3.25 Expressão em larga escala da PtSRP em *E. coli*

Antes da indução em larga escala da PtSRP foi realizado um pré-inóculo com 10µl da cultura congelada em 10 ml de meio LB com ampicilina 100µg/ml da construção plasmidial que foi anteriormente transformada em *E. coli*, em quadruplicata. Os tubos cônicos foram deixados durante a noite a 37°C/ 200 rpm. No dia seguinte, os 10ml do pré-inóculo foram transferidos para 500 ml de meio LB com ampicilina 100µg/ml e incubados a 37°C / 150 rpm, até a cultura atingir uma O.D. de 0,5 (fase log). Em seguida foi adicionado, em cada frasco de Erlenmeyer, o volume de 50µl do indutor IPTG 1M (concentração final de 0,1mM) para que houvesse a expressão da proteína de fusão PtSRP. As amostras foram incubadas por 4 horas a 30°C a 150 rpm. Ao término das 4 horas, alíquotas de 200µl foram pipetadas, centrifugadas e ressuspendidas em 80ul de L2X para serem desnaturadas em SDS-PAGE 15%. O restante das culturas foi transferido para tubos GSA e centrifugados a 10.000 rpm por 10 min. a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi guardado a – 80°C. Foi realizada a eletroforese em SDS-PAGE 15% para checar a indução. As amostras foram dissolvidas em L2x (tampão de proteína) fervidas e em seguida checadas em gel sds-page 15%.

3.26 Purificação da PtSRP em condição nativa

O sedimento congelado a -80°C foi ressuscitado em 20 ml de Tampão de Lise (20 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM NaH_2PO_4 – pH8,0), e em seguida transferido para um Béquer de 20ml. A amostra foi sonicada com uso do *Vibra Cell VCX600 Ultrasonic Processor* em 6 ciclos de 30 seg. em intervalos de 1 minuto, sempre no gelo. Em seguida amostra foi devolvida ao Tubo GSA onde foi adicionado um volume de 200 μl de TRITON X-100 (concentração final 1%). Os tubos de GSA foram centrifugados por 10 min./ 17.700 $\times\text{g}$ a 4°C . O sobrenadante foi mantido no gelo para uso posterior na etapa de incubação na resina e o sedimento remanescente foi armazenado a -20°C .

Antes da incubação, a resina (400 μl da resina Ni-NTA agarose Qiagen) foi pré-equilibrada em tubos cônico de 50 ml contendo 10 ml de PBS 1X, pH 7.2. A amostra foi centrifugada por 5 min./ 5.251 $\times\text{g}$ a 4°C e o sobrenadante descartado. Esta etapa foi repetida 3 vezes.

Depois de equilibrada a resina, esta foi incubada com o sobrenadante por 1 hora a 4°C , sob leve agitação. Passado esse período de incubação, a resina foi centrifugada e o sobrenadante foi desprezado. O sedimento foi ressuscitado em 1 ml de tampão de lavagem (30 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM NaH_2PO_4 – pH8,0) e transferido para microtubos. Os microtubos foram centrifugados por 2 min./ 16.100 $\times\text{g}$ e o sobrenadante foi armazenado. Esta etapa de lavagem foi repetida por mais 3 vezes e os sobrenadantes foram armazenados.

Na sequência, a resina foi eluída por 3 vezes com 500 μl de Wash buffer (0,5 M Imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM NaH_2PO_4 – pH8,0), sob leve agitação por 10 min. a 4°C . Os microtubos foram centrifugados por 2 min./ 16.100 $\times\text{g}$ e os sobrenadantes armazenados. Todas as eluições foram checadas em SDS-PAGE 15%.

3.27 Diálise da PtSRP purificada em condição nativa

Com a finalidade de remover o excesso dos sais minerais utilizados nas soluções de eluição na etapa de purificação, foram realizadas as diálises das amostras da PtSRP. As membranas de diálise foram cortadas e hidratadas em PBS 1X. Com um pedaço de barbante pequeno, a extremidade inferior da membrana foi amarrada e depois fechada

com um garrote de plástico. As eluições foram aplicadas na membrana e, em seguida a extremidade superior foi amarrada com barbante e fechadas com um garrote de plástico. Na parte inferior da membrana foi fixada uma garrafa de vidro contendo PBS 1X. A parte de cima da membrana foi amarrada a um bastão de vidro apoiado num Béquer de 2L. As membranas foram mergulhadas em 2 L de Tampão de diálise pré-resfriados a 4°C, sob leve agitação. O tampão foi trocado 3 vezes a cada 2 horas. Ao final, as amostras ficaram durante a noite nas mesmas condições de incubação. Cuidadosamente a parte superior da membrana foi cortada com uma tesoura e todo o conteúdo (aprox. 10 ml) foi transferido para microtubos de 1,5 ml. Por fim, as amostras foram concentradas em concentrador por 12 horas, em câmara fria a 4°C e armazenado em microtubos nesta mesma temperatura até a etapa de imunização.

3.28 Quantificação através da Curva de BSA da PtSRP purificada em condição nativa

A quantificação da PtSRP nativa foi realizada através da comparação da intensidade da banda da eluição contendo a PtSRP com diluição seriada do BSA: 1ª Diluição: 8µl de BSA + 392µl de L2x = 2µg/µl = 0,2µg/µl; 2ª Diluição: 200µl da 1ª diluição + 200µl de L2x = 1µg; 3ª Diluição: 200µl da 2ª diluição + 200µl de L2x = 0,5µg; 4ª Diluição: 200µl da 3ª diluição + 200µl de L2x = 0,125µg. A PtSRP purificada também foi diluída: 1ª Diluição: 10µl da Eluição + 10µl de L2x (1:2); 2ª Diluição: 10µl da 1ª diluição + 10µl de L2x (1:4); 3ª Diluição: 10µl da 2ª diluição + 10µl de L2x (1:8); 4ª Diluição: 10µl da 3ª diluição + 10µl de L2x (1:16). Em seguida foi preparado um gel SDS-PAGE com 15% de acrilamida e em cada poço foi adicionado um volume de 10µl para cada diluição do BSA e da PtSRP. O gel foi corado, fotodocumentado e a quantidade de proteína foi estimada por regra de três simples.

3.29 Indução em larga escala e purificação da PtSRP sob condição desnaturante

A fim de obter a PtSRP desnaturada, nesta etapa foi utilizada a uréia na composição dos tampões de extração e eluições. No início do processo foi realizado um pré-inóculo com 10µl da cultura congelada em 10 ml de meio LB com ampicilina 100µg/ml. Os tubos cônicos foram deixados durante a noite a 37°C/ 200 rpm e no outro dia, esse pré-inóculo foi transferido para 500 ml de meio LB com ampicilina 100µg/ml,

incubados a 37°C / 150 rpm, até a atingir uma O.D. de 0,5 (fase log). Em seguida foi adicionado o indutor IPTG para uma concentração final de 0,1mM. As amostras foram incubadas por 4 horas a 30°C a 150 GSA foi centrifugado por 10 min./ 17.700×g a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o sedimentado bacteriano foi ressuscitado em 20 ml de Tampão de Lise com uréia (80 mM NaH₂PO₄, 100 mM Tris, 8 M Uréia, 20 mM Imidazole - pH 8,0) agitando-se com as mãos.

Depois foi transferido para um béquer de 20 ml e colocado no gelo para ser sonificado com ciclos de 6 pulsos de 30 seg. e intervalos de 1 min. Todo o conteúdo do béquer foi devolvido ao tubo GSA onde foi adicionado um volume de 200µl de TRITON X-100 (concentração final 1%). As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm/10min. a 4°C, sendo o sedimentado formado armazenado a -20°C. O sobrenadante restante foi incubado com a resina (400ul da resina Ni-NTA agarose Qiagen) previamente equilibrada por 1 hora a 4°C sob leve agitação. Passado esse período de incubação a resina foi centrifugada e o sobrenadante foi desprezado. O sedimentado foi ressuscitado em 1 ml de Tampão de Lavagem com ureia (80 mM NaH₂PO₄, 30 mM Imidazol, 8 M Uréia, 100 mM Tris – pH 6,0) e transferido para microtubos. As amostras foram centrifugadas por 2 min./ 16.100×g, sendo os sobrenadantes armazenados a -80°C. Esta etapa de lavagem foi repetida por mais 3 vezes e os sobrenadantes foram armazenados.

Em seguida, a resina foi eluída três vezes com 500µl de Tampão de Eluição (80 mM NaH₂PO₄, 1M Imidazol, 100 mM Tris, 8 M Uréia – pH 4,6), sob leve agitação por 10 min. a 4°C. As amostras foram centrifugadas por 2 min./ 16.100×g e os sobrenadantes armazenados. Todas as eluições foram checadas em SDS-PAGE 15%. A quantificação da PtSRP purificada com ureia foi realizada através da diluição seriada do BSA (Item 3.28). O gel foi corado, fotodocumentado e a quantidade da proteína PtSRP foi estimada com base nos cálculos matemáticos via regra de três simples.

4. RESULTADOS

4.1 Material biológico e produção de biomassa para a expressão da *PtSRP*

Culturas axênicas do isolado ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pt-103), em placas de Petri (**Figura 2.A**) formaram um denso micélio de coloração marrom claro, de aspecto algodoado e com bordas regulares. Adicionalmente foi obtida biomassa em meio líquido MNM (**Figura 2.B**) a partir da cultura em placa. Esta biomassa foi utilizada para a extração de RNA/DNA/proteína.

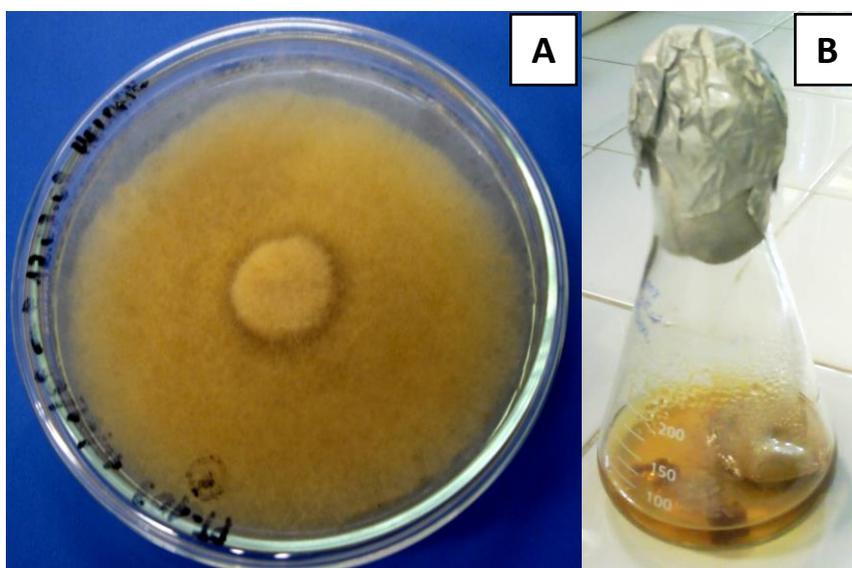


Figura 2. Aspecto macroscópico do isolado ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pt-103) em meio sólido Melin-Norkrans Modificado - MNM (MARX, 1969) (A). Cultivo do isolado em meio líquido e obtenção da biomassa após um mês (B).

4.2 Síntese de cDNA e confirmação do Gene *PtSRP* do fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*

Após a extração do RNA total do isolado ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pt-103) foi realizada a reação de transcrição reversa para a síntese do DNA complementar, processo que polimeriza moléculas de DNA a partir de moléculas de RNA. Em seguida, foram realizadas reações de PCR direcionadas a região 3' do mRNA do gene *PtSRP* para a confirmação da presença deste mensageiro na amostra. Como resultados foram obtidos dois fragmentos: um de 237pb (PCR 1) e o outro de tamanho menor de aprox. 120 pb (PCR 2) como visualizado na **Figura 3**.

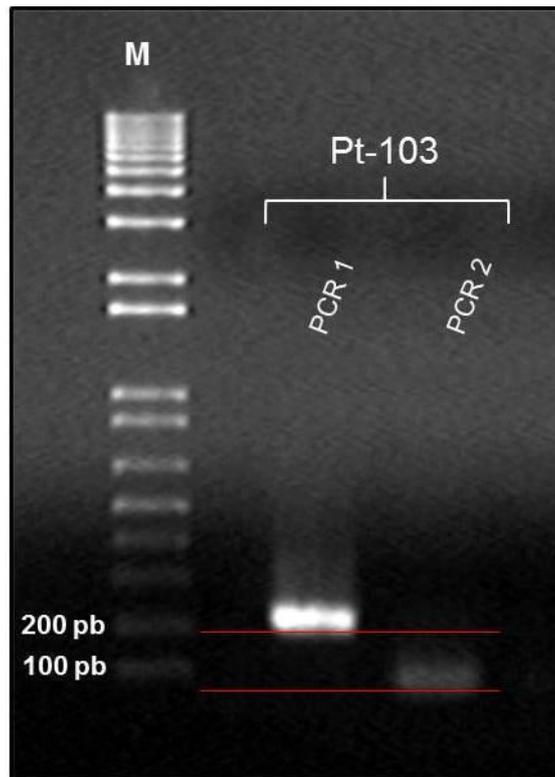


Figura 3. Fotodocumentação da eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio onde são observados os fragmentos PCR1 (237pb) e PCR2 (120pb) correspondentes à região 3' do mRNA do gene *PtSRP*. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram estimados com base no marcador molecular (M) 1Kb plus DNA Ladder, Invitrogen®.

4.3 PCR de amplificação do *PtSRP* completo

A isolamento e obtenção do mRNA completo do gene *PtSRP* foi confirmada por reações de PCR em quadruplicata, a partir do produto da transcrição reversa. Se observam à direita do marcador molecular 1 kbplus DNA Ladder - Invitrogen®, amplicons esperados de aprox. 604pb correspondentes ao mRNA completo do gene *PtSRP* (Figura 4).

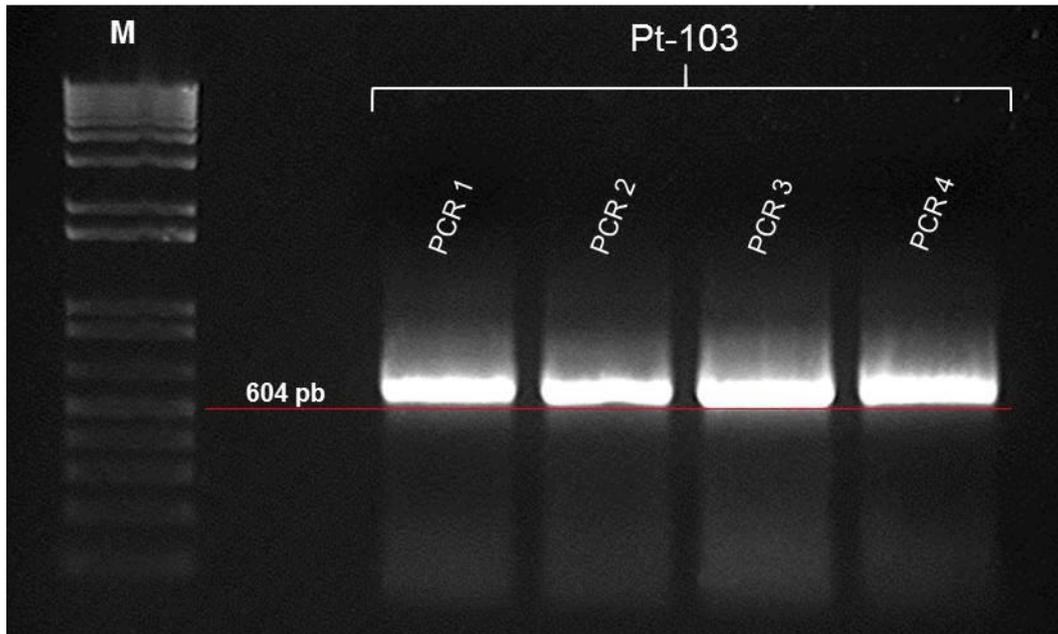


Figura 4. Fotodocumentação da eletroforese em gel de agarose, TAE 1% onde são observados fragmentos de aprox. 604pb, correspondentes ao mRNA completo do gene *PtSRP* em quadruplicata (PCR1, PCR2, PCR3 e PCR4). M = Marcador molecular 1Kb plus DNA Ladder, Invitrogen®.

4.4 Edição e alinhamento da sequencia obtida por PCR, com a via RACE 5'

Os dados do sequenciamento do fragmento de 604pb geraram uma sequencia consenso final de 604 bp. Esta nova sequencia foi alinhada com a sequencia *contig* de 636pb obtida *in silico* via RACE 5' e mostrou alterações em dois pontos na sequencia de nucleotídeos nas posições 291 C/T e 306 A/C. Ambas ocorreram na região onde está a ORF putativa mais provável (**Figura 5**). Na comparação das sequencias onde seriam as regiões das ORFs mais prováveis traduzidas observou-se que o novo fragmento (604pb) apresenta o início da tradução na posição 49 e a terminação da tradução a partir do nucleotídeo 425. Também foram encontradas as regiões não traduzíveis do mensageiro além da seqüência Kozak com variações.

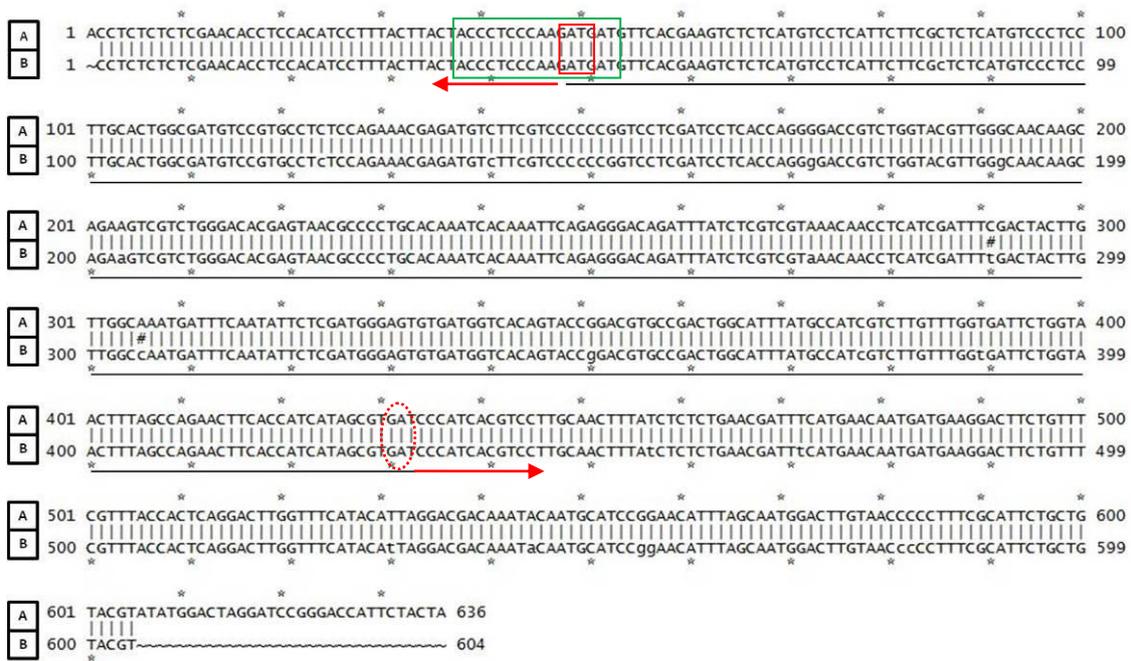


Figura 5. Alinhamento entre a sequência montada via RACE 5'(636 pb; A) e a obtida diretamente via PCR, clonagem e sequenciamento (604pb; B) indicando apenas 2 mudanças de nucleotídeos nas posições 291C/T e 306 A/C (#). — : ORF do gene *PtSRP*; (←) UTR 5' e (→) UTR 3'; (□) Início da tradução e (○) término da tradução.

4.5 Tradução *in silico* e comparação da ORF do gene *PtSRP* via RACE 5' com a obtida por PCR

Na comparação das ORFs putativas mais prováveis e que foram traduzidas *in silico*, observou-se que ambas codificam para um peptídeo de 127 Aa com uma metionina inicial no códon 49 e um *Stop-codon* a partir do nucleotídeo 425. O alinhamento também mostrou que houve uma divergência pontual no resíduo de aminoácido de número 65 se comparada a sequência obtida via PCR com a RACE 5' o que corresponde a Serina na sequência A por Treonina na sequência B (**Figura 6**).

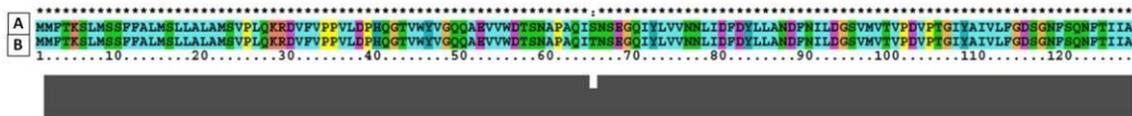


Figura 6. Alinhamento entre as ORFs traduzidas da sequência montada via RACE 5'(636 pb; A) e a obtida diretamente via PCR (604pb; B). (*) Alinhamento perfeito; (:) Divergência no alinhamento indicando apenas 1 mudança no resíduo de aminoácidos 65 (Serina na sequência A e Treonina na sequência B).

4.6 PCR da ORF do gene *PtSRP* com sítios de restrição *EcoR*I/*Xho*I e clonagem em vetor pJET 1.2 – Fermentas®

Na amplificação da ORF do Gene *PtSRP* foi utilizado um par de oligonucleotídeos engenheirado com sítios de restrição para as enzimas *EcoR*I e *Xho*I (Figura 7).

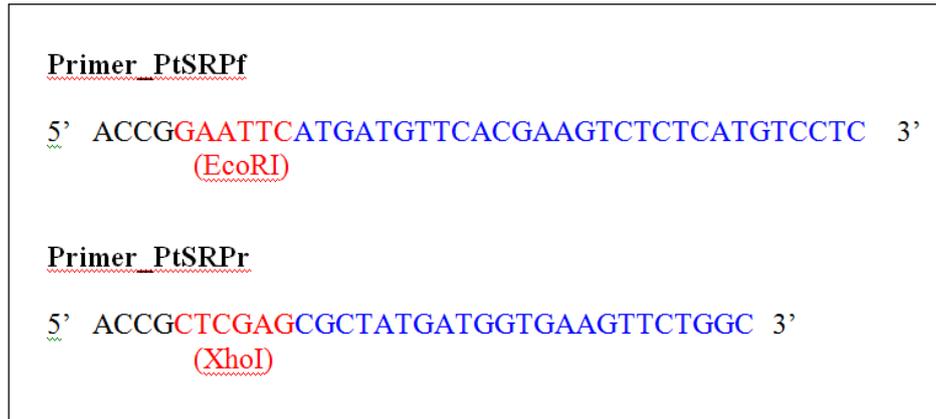


Figura 7. Sequência dos *primers* senso (Primer_*PtSRP*f) e anti-senso (Primer_*PtSRP*r) com sítios de restrição para as enzimas *EcoR*I e *Xho*I. (Em preto= Bases adicionadas para a ancoragem da enzima de restrição; em vermelho= sítios de restrição das enzimas; em azul= sequência de anelamento complementar à região 5' e 3'da ORF do Gene *PtSRP*).

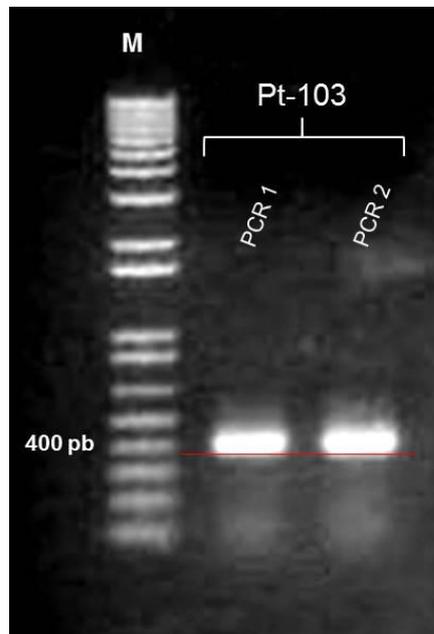


Figura 8. Fotodocumentação da eletroforese em gel de agarose 1% TAE da amplificação em duplicata (PCR1 e PCR2) da ORF do gene *PtSRP* completo com sítios de restrição, onde observam-se amplicons de 401pb. M= marcador molecular 1kbplus DNA Ladder - Invitrogen®.

O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose e fotodocumentado (**Figura 8**). À direita do marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder - Invitrogen®, observam-se, nos dois poços, amplicons de aprox. 401pb referentes a ORF do Gene *PtSRP* com os sítios de restrição para as enzimas *EcoR1* e *Xho1*.

Uma alíquota deste produto de PCR contendo o fragmento de 401pb foi clonado em vetor comercial pJET1.2 da Fermentas®. Em seguida, a clonagem foi confirmada através da realização de PCR-colônia onde foram obtidos 10 clones positivos (**Figura 9**). Como resultado foram obtidos amplicons de 401pb que confirmam a clonagem do fragmento do *PtSRR1* em vetor pJET 1.2, Fermentas®.

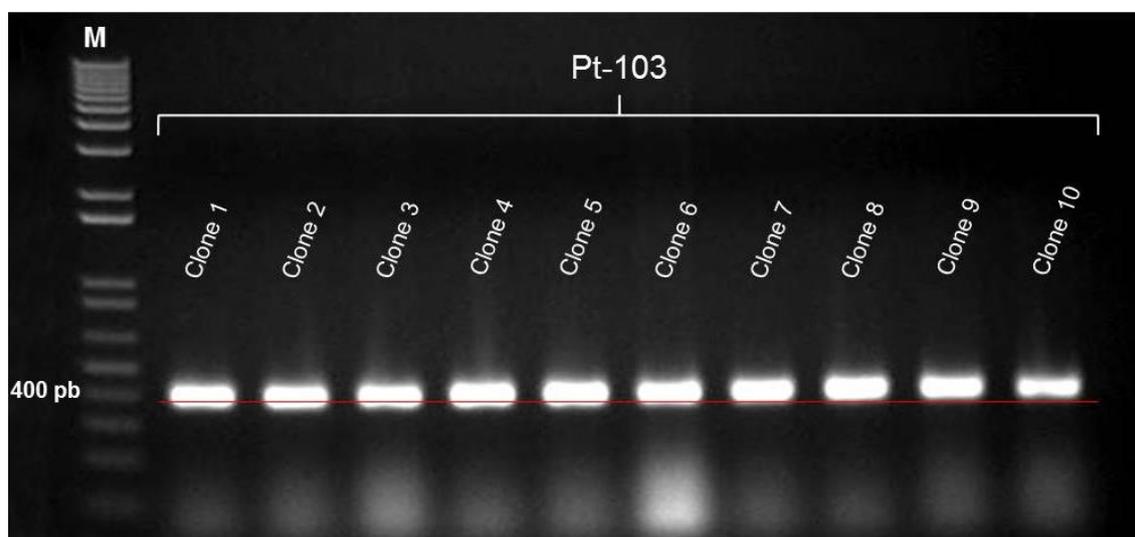


Figura 9. Confirmação da clonagem do gene *PtSRR1* de 401pb em vetor pJET 1.2 . M= marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder - Invitrogen®.

Após a realização de Minipreparações dos clones positivos e extração dos plasmídeos recombinantes, estes foram sequenciados. A partir dos dados obtidos foi possível confirmar a fidelidade da sequência da ORF, bem como a preservação dos sítios de restrição para as enzimas *EcoR1*/*Xho1* (**Figura 10**) importantes nas etapas subsequentes de clonagem.

```

ACCGGAATTCATGATGTTACGAAAGTCTCTCATGTCCTCATTCTTCGCTCTCATGTCCCTCCTTGCACTGG
CGATGTCCGTGCCTCTCCAGAAACGAGATGTCTTCGTCCTCCCGGTCTCGATCCTCACCAGGGGACCG
TCTGGTACGTTGGGCAACAAGCAGAAGTCGTCTGGGACACGAGTAACGCCCTGCACAAATCACAAAT
TCAGAGGGACAGATTTATCTCGTCGTAACAACCTCATCGATTCGACTACTTGTGGCAAATGATTTC
ATATTCTCGATGGGAGTGTGATGGTCACAGTACCGGACGTGCCGACTGGCATTATGCCATCGTCTTGT
TTGGTGATTCTGGTAACTTAGCCAGAACTTCACCATCATAGCGCTCGAGCGGT

```

Figura 10. Resultado do sequenciamento do clone 04 após edição no ApE v 1.15. Legenda: A,C,T,G= representam os nucleotídeos, _____= Representam o par de primers desenhados para a amplificação do gene *PtSRP*, em cinza= ORF do Gene *PtSRP*.

4.7 Clonagem da ORF do gene *PtSRP* em vetor de expressão pET21D(+)

Após a reação de digestão utilizando-se as enzimas de restrição EcoR1/Xho1 para a retirada do Gene *PtSRP* do vetor pJET1.2, o produto foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% sendo o resultado observado em transluminador e fotodocumentado (**Figura 11**). Como resultado, foram obtidos 2 fragmentos: o primeiro de 5kb que correspondente ao vetor pJET1.2 e segundo o de ~401pb que corresponde ao inserto. A banda do gel correspondente a ORF do Gene *PtSRP* foi cortada, purificada e armazenada a -20°C.

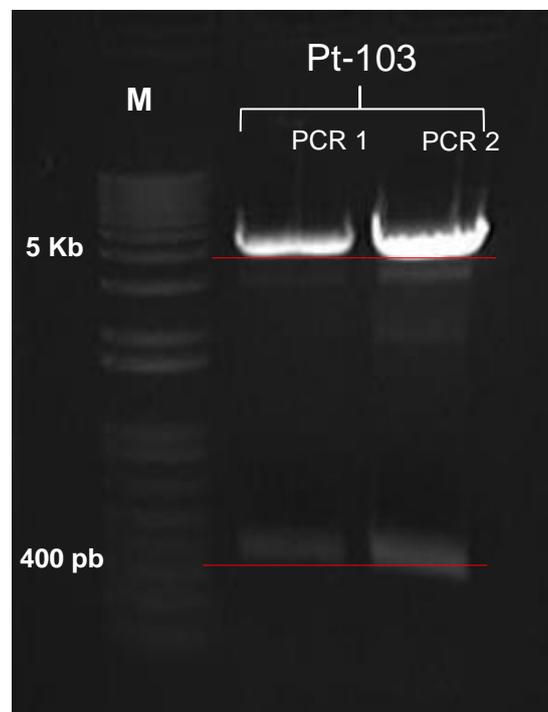


Figura 11. Confirmação da clonagem do gene *PtSRP* de 401pb em vetor pJET 1.2. M= marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder - Invitrogen®.

Após essa etapa, foi realizada a digestão seriada do pET21D(+) inicialmente com a enzima EcoR1 (**Figura 12 A**) e em seguida com a enzima Xho1(**Figura 12 B**). O produto foi purificado e em seguida uma alíquota foi submetida a eletroforese em gel de agarose, em tampão TAE 1X a 100V/ 1hora. O resultado foi fotodocumentado (**Figura 12 C**) e se observou um amplicon de 5kb, correspondente ao vetor pET21D(+) linearizado após dupla digestão.

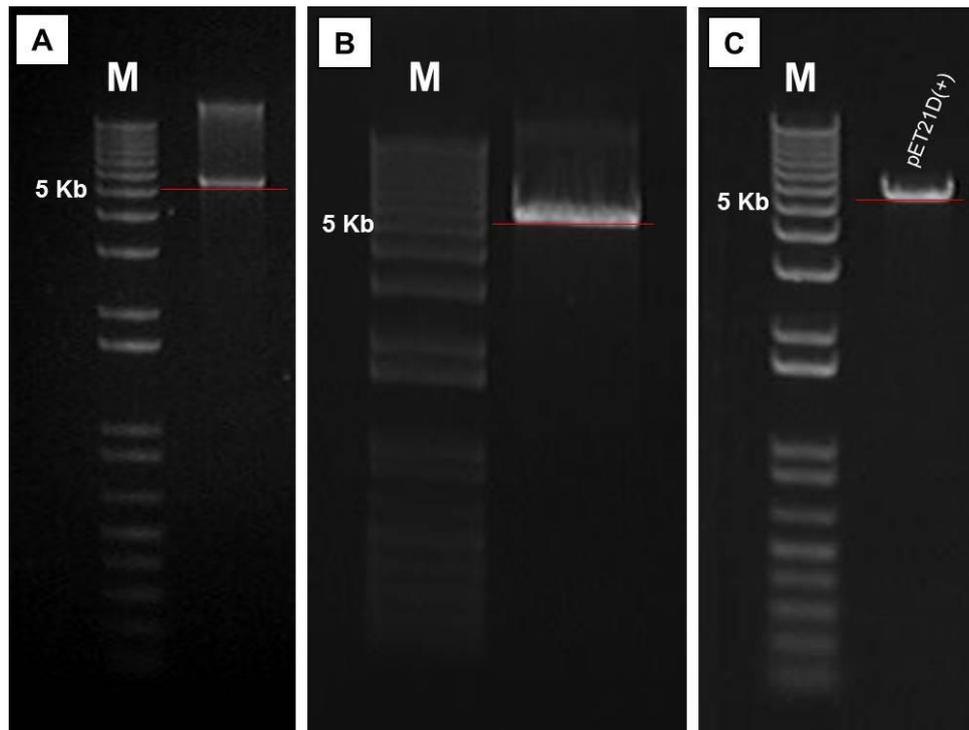


Figura 12. Digestão do vetor PET21D(+) com a enzima EcoR1 (**A**) e digestão do vetor PET21D(+) com a enzima Xho1 (**B**). Confirmação da digestão dupla do vetor PET21D(+) (**C**). M= marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder - Invitrogen®.

O vetor pET21D(+) digerido e purificado foi ligado ao fragmento de 401pb correspondente a ORF do Gene *PtSRP*. Em seguida, este foi utilizado para transformar células DH10B e os clones selecionados foram confirmados através de reações de PCR-colônia (**Figura 13**). Foram obtidos amplicons de ~401pb que confirmam a clonagem do fragmento *PtSRP* no vetor PET21D(+). Dos 10 clones selecionados, todos foram positivos para esta técnica.

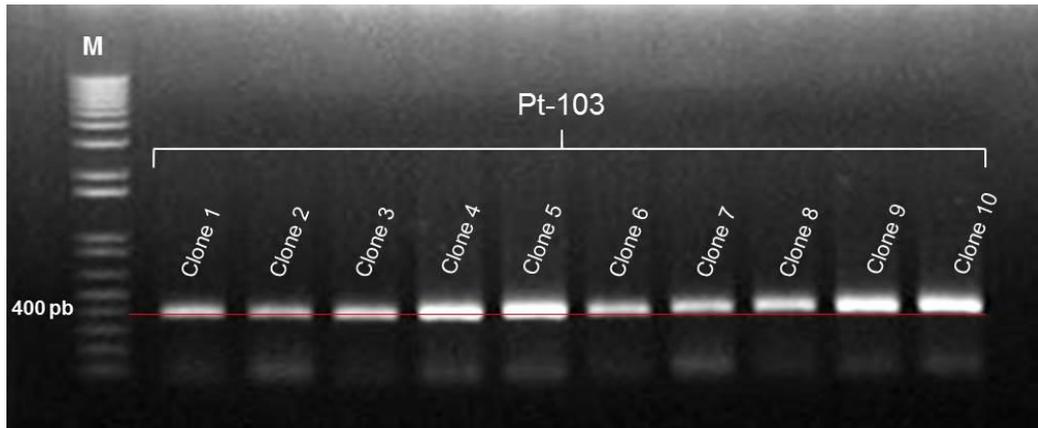


Figura 13. Confirmação da clonagem do Gene *PtSRP* de 401pb em vetor pET21D(+). e transformado em DH10B. M = marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder - Invitrogen®.

4.8 Expressão em pequena escala da *PtSRP* em *E. coli*

Ao final do processo de expressão em pequena escala da *PtSRP* em sistema bacteriano foram visualizadas, no gel de eletroforese SDS-PAGE 15% poliacrilamida, bandas correspondentes a proteína, no tamanho de 16kDa, tanto na presença ou ausência do indutor de expressão: o IPTG. Nos controles negativos não se observou proteína no tamanho correspondente (Colunas 1, 2 e 3). Como esperado, houve um aumento na expressão da *PtSRP* após a adição do IPTG na cultura líquida, como pode ser percebido (**Figura 14**) nas colunas 6 e 7.

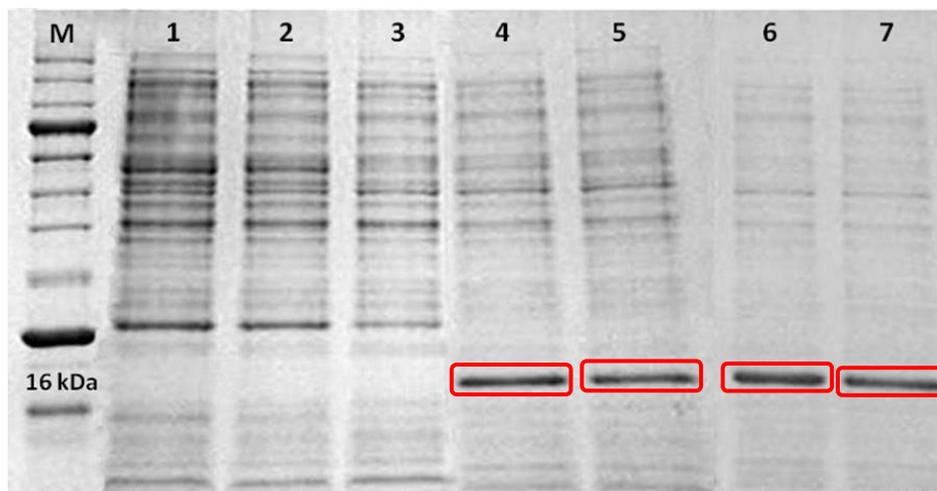


Figura 14. Gel de eletroforese SDS-PAGE para visualização da *PtSRP*, expressa em sistema bacteriano. As bactérias transformadas foram crescidas em meio de cultura e induzidas a expressar as respectivas proteínas recombinantes (em pequena escala), utilizando IPTG. Os extratos bacterianos foram fracionados em gel 15% de poliacrilamida e visualizados por coloração de azul de Coomassie. M: marcador de peso molecular Precision Plus Dual Color – Biorad®, 1: B1-21 sem plasmídeo, 2: B1-21 com vetor selvagem, 3: B1-21 Star (Invitrogen®) com outra proteína, 4: Clone 1 pré-indução, 5: Clone 2 pré-indução, 6: Clone 1 pós-indução, 7: clone 2 pós-indução; (□): Fração correspondente a proteína *PtSRP*.

4.9 Detecção da PtSRP por *Western blot*

A fim de confirmar a expressão em pequena escala da PtSRP foi realizada a técnica de *Western blot* utilizando anticorpos primários capazes de reconhecer a cauda de histidina da PtSRP. Após a incubação da membrana com o anticorpo secundário e revelação do filme, pela ação da peroxidase que emite fluorescência, foi possível ver a marcação das amostras 3, 4, 5 e 6 na fração correspondente a PtSRP. Não houve marcação nos controles negativos: amostras 1 e 2 (**Figura 15**). Tanto na pré-indução como na pós-indução também foi marcada proteína com peso molecular menor e isso se deu provavelmente devido à degradação da PtSRP.

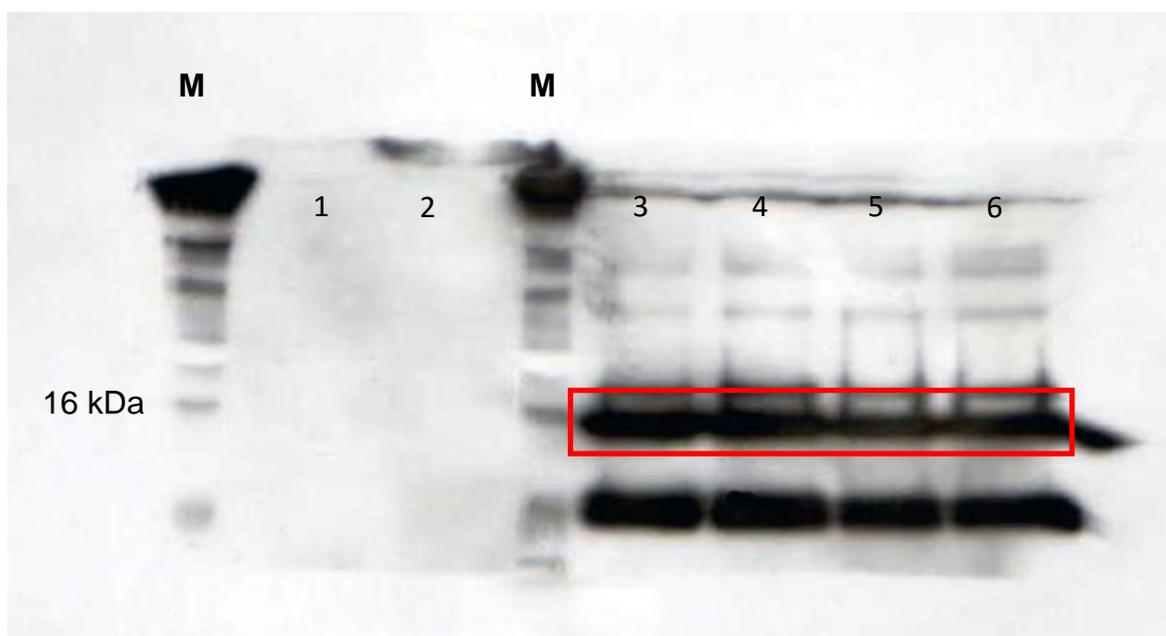


Figura 15. *Western blot* da expressão, em pequena escala, da PtSRP em sistema bacteriano. M: marcador de peso molecular Precision Plus Dual Color – Biorad®, 1: BI-21 sem plasmídeo, 2: BI-21 com outro vetor, 3: Clone 1 pré-indução, 4: Clone 2 pré-indução, 5: Clone 1 pós-indução, 6: clone 2 pós-indução; (□): Fração correspondente da proteína PtSRP.

4.10 Purificação da PtSRP em condição nativa

Confirmada a expressão da PtSRP, em pequena escala, deu-se seguimento com a expressão em larga escala e purificação da proteína PtSRP em condição nativa (neste processo de purificação não foi utilizada a uréia). Alíquotas das lavagens, eluições, sobrenadante e resina final foram submetidas a gel de SDS-Page 15% de acrilamida. O resultado demonstrou a presença de proteínas com tamanho (kDa) correspondente a PtSRP em maior intensidade no sedimento final, na 1ª e 2ª eluições, bem como na resina final. Um banda de intensidade fraca correspondente a PtSRP foi observada no sobrenadante final além da 1ª, 2ª, 3ª e 4ª lavagens (**Figura 16**).

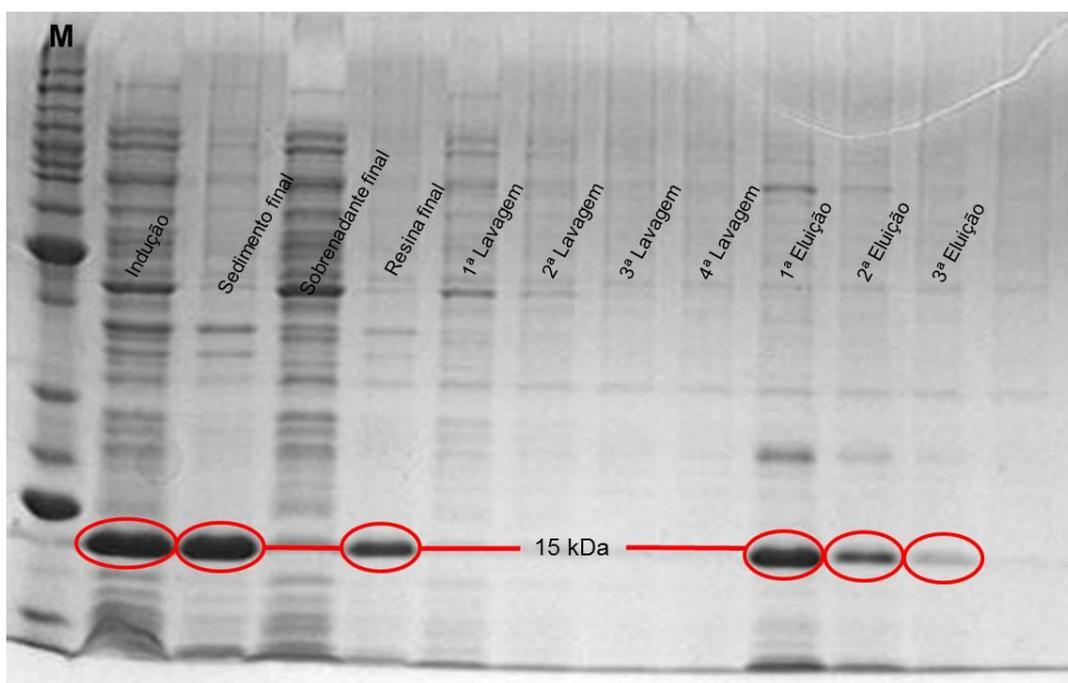


Figura 16. Gel de eletroforese da purificação da PtSRP em condição nativa. Observa-se neste gel de 15% de poliacrilamida, a purificação da PtSRP nas suas diferentes etapas, desde a indução até a 3ª eluição. M: marcador de peso molecular Precision Plus Dual Color – Biorad®; (○): Fração correspondente da PtSRP purificada.

A **Figura 17** mostra a quantificação da PtSRP purificada sem ureia. Esta quantificação utilizou a análise comparativa da curva da diluição seriada de BSA para estimar a quantidade de proteína presente na amostra.

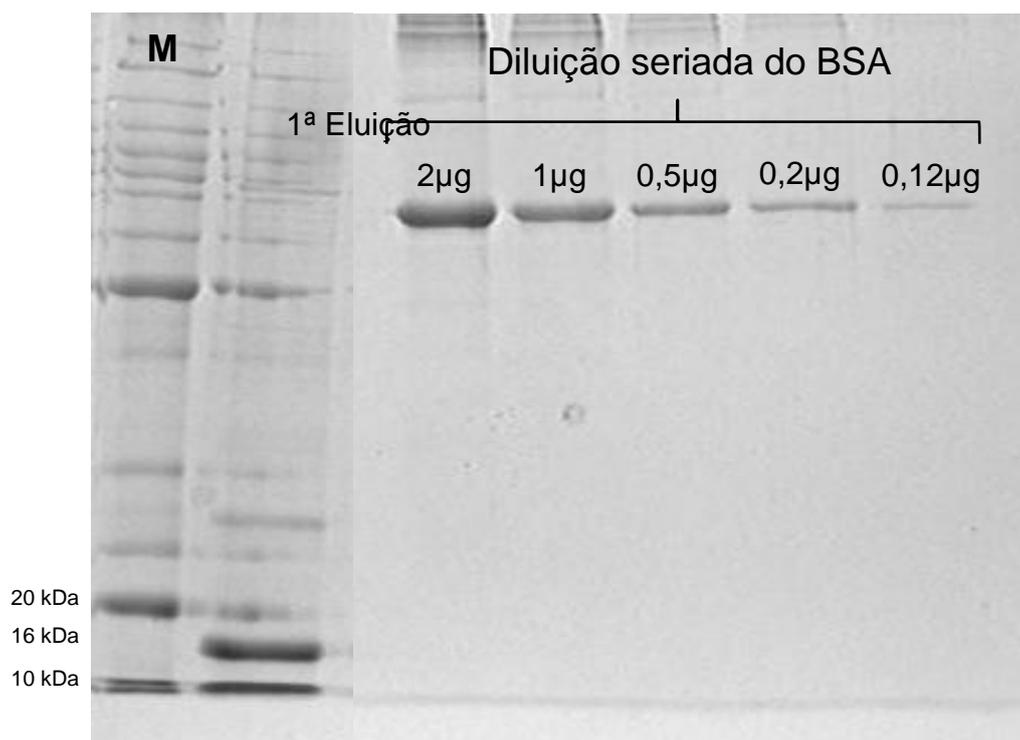


Figura 17. Quantificação estimada através da curva da diluição seriada de BSA da PtSRP purificada sob condição nativa. M: marcador de peso molecular Precision Plus Dual Color – Biorad®, 1ª Eluição: Eluição 1 da PtSRP purificada sem ureia; Diluição seriada de BSA: quantidades de BSA correspondentes de 2 a 0,125µg.

4.11 Expressão em larga escala da PtSRP e sua purificação sob condição desnaturante

A purificação da PtSRP com ureia demonstrou que grande quantidade da proteína foi obtida nas eluições 1 e 2 e na lavagem 0, 1, 2, 3 e 4, bem como no sobrenadante pós-resina. Nada foi observado na resina final, nem no sedimento. No entanto, uma grande quantidade da PtSRP foi obtida na 1ª e 2ª eluições e nas lavagens 1, 2, 3 e 4 como mostra a **Figura 18**.

A **Figura 19** mostra a quantificação da PtSRP purificada com ureia. Esta quantificação utilizou a análise comparativa da curva da diluição seriada de BSA para estimar a quantidade de proteína presente.

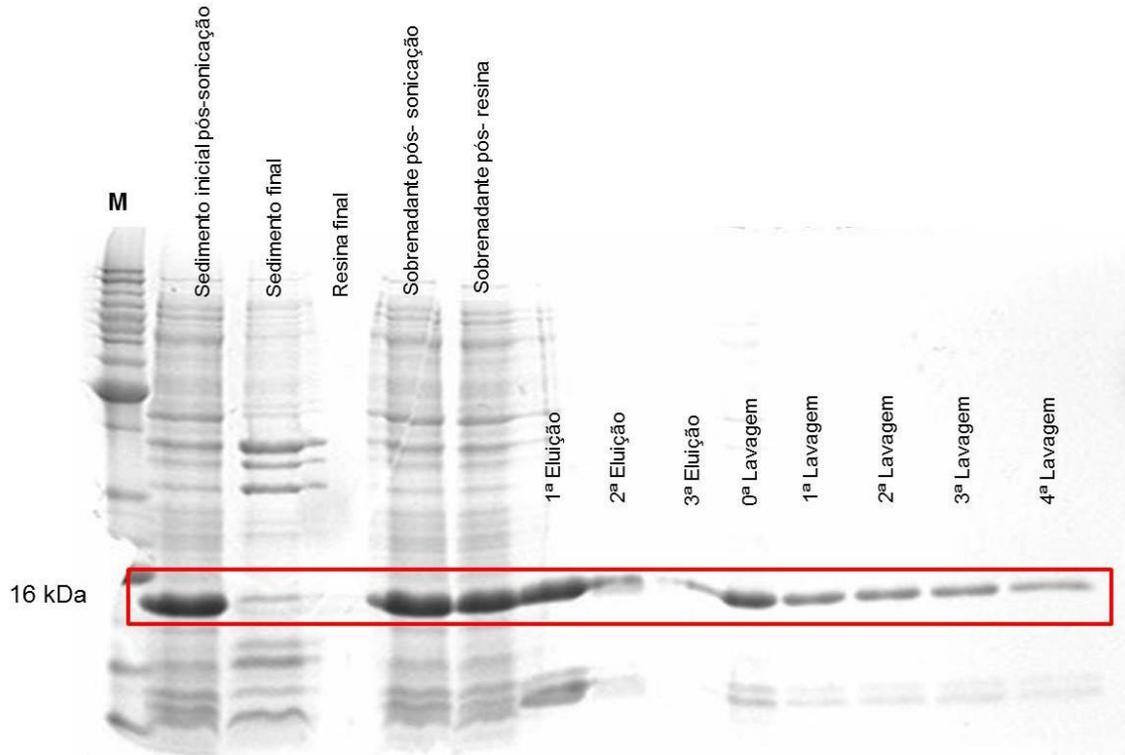


Figura 18. Gel de SDS-PAGE da purificação da PtSRP sob condição desnaturante. Observa-se neste gel de 15% de acrilamida a purificação da PtSRP com ureia, nas suas diferentes etapas, desde o sedimento inicial pós-sonicação até a 4ª lavagem. M: marcador de peso molecular Precision Plus Dual Color – Biorad®; (□): Fração correspondente da PtSRP.

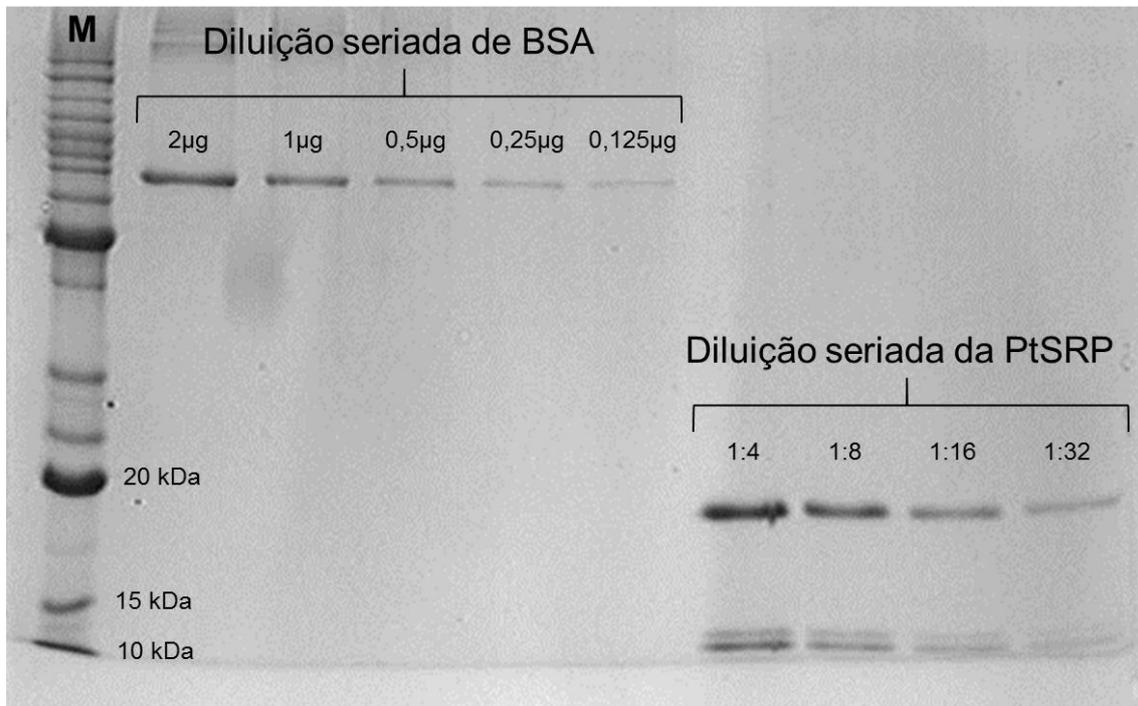


Figura 19. Quantificação estimada através da curva da diluição seriada de BSA da PtSRP purificada em condição desnaturante. M: marcador de peso molecular Precision Plus Dual Color – Biorad®. Diluição seriada de BSA: quantidades de BSA correspondentes de 2 a 0,125µg. Diluição seriada da PtSRP a partir da diluição de 1:4 até 1:32.

5. DISCUSSÃO

As ectomicorrizas se formam pela diferenciação morfo-fisiológica de estruturas e expressão coordenada de inúmeros genes regulados pela simbiose, sob ação do ambiente (SMITH & READ, 2008). Muitos desses genes são ainda de função desconhecida.

Um destes genes de função desconhecida, inicialmente batizado de *PtSRR1* (*Pisolithus tinctorius symiosis related receptor 1*) foi isolado parcialmente a partir da interação entre *Pisolithus tinctorius*-*Castanea sativa* na fase pré-simbiótica, mais especificamente entre 6-12 horas do contato (ACIOLI-SANTOS et al., 2009). Esta sequência isolada da porção 3' do gene apresentou 432pb. Em trabalho complementar, que focou na definição da porção 5' via RACE, foi obtido o fragmento restante representado por 355pb, definindo putativamente o gene completo (*PtSRP*, *Pisolithus tinctorius related protein*) em 604pb (VIEIRA et al., 2012).

A determinação preliminar da região codificante (ORF) de uma sequência desconhecida é dada geralmente pela maior sequência codificante possível naquela molécula (intervalo entre um codón de iniciação e outro de terminação da transcrição), visto que, dentro dos transcritos, podem existir potenciais códons de iniciação (ATG que define um aminoácido metionina na cadeia em construção) que poderão estar apenas atuando como partes estruturais da molécula. No presente trabalho, com a sequência completa do *PtSRP* (604pb) foram encontradas as regiões não traduzíveis do mensageiro (UTRs) além da sequência Kozak com variações em três nucleotídeos -6 (C), -2 (A), -1(G) e 4 (A) se comparada a sequência original (gcc Rcc AUG G), confirmando as análises realizadas por Vieira et al. (2012).

Na comparação do gene seqüenciado (cDNA), o fragmento de 604pb correspondente ao gene *PtSRP* mostrou identidade (78%) com uma sequência de *Pisolithus microcarpus* (CB010071; PETER et al., 2003) em associação ectomicorrízica com *Eucalyptus globulus* e uma identidade maior de 81% com outra sequência de cDNA de fungo a quatro dias da interação na ectomicorriza formada entre *Pisolithus tinctorius*-*Eucalyptus globulus* (BF942674; VOIBLET et al., 2001). A sequência de 636pb (contig dos fragmento RACE com a porção 3', da construção anterior) havia apresentado identidade de 78 % para as duas comparações acima citadas (VIEIRA et al., 2012).

Adicionalmente, o estudo da comparação de sequências das construções via contig (636pb) com a obtida do sequenciamento direto (604pb) mostrou alterações em dois pontos: o primeiro na posição 291 C/T (transição) e outro na posição 306 A/C (transversão). Esta última mudança de base ocorreu na região que compreende a ORF mais provável e acarretou alteração do resíduo de aminoácido de número 65, no qual um serina foi alterada por uma treonina (VIEIRA et al., 2012). Além disso, foi investigada a presença de domínios de interesse biotecnológico dando-se ênfase no domínio RGD de ligação das integrinas (arginina - glicina – ácido aspártico), uma proteína que tem sido relacionada à adesão celular, característica fundamental nos estágios iniciais de formação de ectomicorrizas (RUOSLAHTI, 1996) e que já foi encontrada em algumas SRAPs (LAURANT et al., 1999).

A presença deste domínio RGD no gene *PtSRP* estudado não constitui uma condição obrigatória, dado que outros genes presentes nos sistemas ectomicorrízicos em formação não contêm esse domínio (por exemplo, *SC13* e *SC25*, NEHLS et al., 1999; e *Lbras*, SUNDARAM et al., 2001). Nas demais análises como a predição de estrutura secundária e presença de sítios de modificações pós-traducionais, como fosforilação e glicosilação, foram observados os mesmos achados da sequência anterior (via contig): dois sítios de fosforilação da caseína-quinase II (resíduos 65-68, TNSE e resíduos 99-102, TVPD) e dois sítios de N-glicosilação (resíduos 118-121, NFSQ e resíduos 122-125, NFTI) (VIEIRA et al., 2012).

Os resultados com a expressão em larga escala da *PtSRP* em sistema procarioto mostrou que havia diferença no peso molecular da *PtSRP* estimada por bioinformática (VIEIRA et al., 2012) e o peptídeo obtido em sistema bacteriano. Nas análises bioinformacionais o peptídeo putativo teria um peso molecular de 13,969kDa ao passo que no gel desnaturante de poliacrilamida 15%, o peso molecular da proteína expressa *in vivo* foi de aproximadamente 16kDa. Esse aumento no peso molecular da proteína pode ser justificado pelo aumento de seis histidinas adicionados no momento da clonagem em vetor de expressão.

A *PtSRP* foi então confirmada com as análises de *Western blot* através de marcação que utilizou anticorpos específicos para a cauda de histidina citada. Essa estratégia de clonagem com uso da histidina já foi utilizada em outras experimentações e tem se mostrado uma ferramenta bastante eficiente em modelos experimentais ectomicorrízicos (KIM et al., 1998, 1999; AGOSTINI et al., 2001).

Pelo tamanho do peptídeo expresso e das características citadas, dois grandes grupos de proteínas chamam a atenção como tendo potencial relação com a *PtSRP*: (a) as SRAP (*Symbiosis Related Acid Proteins*); transcritos para essas proteínas foram descritos a dois dias do contato durante o processo de simbiose (VOIBLET et al., 2001; DUPLESSIS et al., 2005; LAURENT et al., 1999) embora não seja visto para o mesmo período em que foram encontrados transcritos do *PtSRP* (ACIOLI-SANTOS et al., 2009); (b) as hidrofobinas, por serem de pequena massa, possuem natureza hidrofóbica e terem sido encontradas em diversas interações (TAGU et al., 1996; ACIOLI-SANTOS et al., 2010)

Por tudo que foi observado e a partir da proteína *PtSRP* purificada, conclui-se que esta poderá ser utilizada na imunização em animais com o objetivo de se obter anticorpos anti-*PtSRP* e posterior utilização desses anticorpos em testes de imunolocalização para a detecção desta proteína no fungo *Pisolithus tinctorius*. Esses novos resultados da clonagem da ORF, expressão e purificação da *PtSRP* trouxeram novas perspectivas para o entendimento do seu real papel no desenvolvimento da simbiose.

6. CONCLUSÕES

- O gene *PtSRP* amplificado de cDNA do fungo *P. tinctorius* apresentou uma identidade significativa com sequência obtida pela formação de contig das ESTs isoladas de biblioteca de cDNA (3') com a amplificada via RACE (5'), confirmando as predições anteriores;
- A ORF mais provável foi clonada, sendo a proteína *PtSRP* capaz de ser expressa em sistema procarioto e purificada via cromatografia de afinidade, dados que confirmam, igualmente, as análises anteriores.

REFERÊNCIAS

- ACIOLI-SANTOS, B. Expressão gênica no fungo *Pisolithus tinctorius* em etapas iniciais da interação ectomicorrízica com *Castanea sativa*: estudo do padrão de transcrição e de possíveis fatores de regulação da simbiose. Lisboa: Universidade de Lisboa, Departamento de Biologia Vegetal (Tese), 169 p., 2006.
- ACIOLI-SANTOS, B.; MALOSSO, E.; CALZAVARA-SILVA, C.E.; LIMA, C.E.P.; FIGUEIREDO, A.; SEBASTIANA, M.; PAIS, M.S. *PtSRRI*, a putative *Pisolithus tinctorius* symbiosis related receptor gene is expressed during the first hours of mycorrhizal interaction with *Castanea sativa* roots. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.40(2), p. 292-295, 2009.
- ACIOLI-SANTOS, B.; SEBASTIANA, M.; PESSOA, F.; SOUSA, L.; FIGUEIREDO, A.; FORTES, A.M.; BALDE, A.; MAIA, L.C.; PAIS, M.S. Fungal Transcript Pattern During the Preinfection Stage (12 h) of Ectomycorrhiza Formed Between *Pisolithus tinctorius* and *Castanea sativa* Roots, Identified Using cDNA Microarrays. **Current Microbiol**, v.57, p.620-625, 2008.
- ACIOLI-SANTOS, B.; VIEIRA, H.E.E.; LIMA, C.E.P.; MAIA, L.C. The Molecular Ectomycorrhizal Fungus Essence In Association: A Review Of Differentially Expressed Fungal Genes During Symbiosis Formation. In: Eds. M.K. Rai and A.K. Varma. (Org.). **Diversity and Biotechnology of Ectomycorrhiza**. 1Ed. New York: Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 2010.
- AGOSTINI, D.; POLIDORI, E.; PALMA, F.; CECCAROLI, P.; SALTARELLI, R.; TONELLI, D.; STOCCHI, V. Cloning, expression, and characterization of the *hvk-1* Gene from the white truffle *Tuber borchii* Vittad.: A first step toward understanding sugar metabolism. **Fungal Genet Biol**, v.33, p.15-23, 2001.
- BARKER, S.J.; TAGU, D.; DELP, G. Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbiosis. **Plant Physiology**, v.116, p.1201-1207, 1998.
- BONFANTE-FASOLO, P.; SPANU, P. Pathogenic and endomycorrhizal association. In: MORRIS, J. R.; READ, D.; VARMA, A. K. (Eds.). **Techniques for Mycorrhizal Research - Methods in Microbiology**. Academic Press, London, p.602-628, 1994.
- BÜCKING, H.; LIEPOLD, E.; AMBILWADE, P. The Role of the Mycorrhizal Symbiosis in Nutrient Uptake of Plants and the Regulatory Mechanisms Underlying These Transport Processes. **Agricultural and Biological Science**, Chapter 4, 2012.

- CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. Microbiologia do Solo. Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, Campinas (SP), 1992.
- DUPLESSIS, S.; COURTY, P.; TAGU, D.; MARTIN, F. Transcript patterns associated with ectomycorrhiza development in *Eucalyptus globulus* and *Pisolithus microcarpus*. **New Phytologist**, v.165, p.599-611, 2005.
- HILBERT, J.L.; COSTA, G.; MARTIN, F. Ectomycorrhizal synthesis and polypeptide changes during the early stage of eucalypt mycorrhiza development. **Plant Physiology**, v.97, p.977-984, 1991.
- KIM, S.; SHIVANAND, T.; PODILA, G. Cloning and identification of symbiosis-regulated genes from the ectomycorrhizal *Laccaria bicolor*. **Mycological Research**, v.103, n.2, p.168-172, 1999.
- KIM, S.J.; ZHENG, J.; HIREMATH, S.T.; PODILA, G.K. Cloning and characterization of a symbiosis-related gene from an ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. **Gene**, v.222, p. 203-212, 1998.
- LAURENT, P.; VOIBLET, C.; TAGU, D.; CARVALHO, D.; NEHLS, U.; DE BELLIS, R.; BALESTRINI, R.; BAUW, G.; BONFANTE, P.; MARTIN, F. A novel class of ectomycorrhiza-regulated cell wall polypeptides in *Pisolithus tinctorius*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.12, n.10, p.862-871, 1999.
- LE QUÉRÉ, A.; SCHÜTZENDÜBEL, A.; RAJASHEKAR, B.; CANBÄCK, B.; HEDH, J.; ERLAND, S.; JOHANSSON, T.; TUNLID, A. Divergence in gene expression related to variation in host specificity of an ectomycorrhizal fungus. **Molecular Ecology**, v.13, p.3809-3819, 2004.
- LE QUÉRÉ, A.; WRIGHT, D. P.; SÖDERSTRÖM, B.; TUNLID, A.; JOHANSSON, T. Global patterns of gene regulation associated with the development of ectomycorrhiza between birch (*Betula pendula* Roth.) and *Paxillus involutus*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.18, p.659-673, 2005.
- MARTIN, F.; AERTS, A.; AHRE'N, D.; BRUN, A.; DANCHIN, E.G.J.; DUCHAUSSOY, F.; GIBON, J.; KOHLER, A.; LINDQUIST, E.; PEREDA, V.; SALAMOV, A.; SHAPIRO, H.J.; WUYTS, J.; BLAUDEZ, D.; BUE'E, M.; BROKSTEIN, P.; CANBECK, B.; COHEN, D.; COURTY, P.E.; COUTINHO, P.M.; DELARUELLE, C.; DETTER, J.C.; DEVEAU, A.; DIFAZIO, S.; DUPLESSIS, S.; TACHET, L. F.; LUCIC, E.; KLETT, P.F.; FOURREY, C.; FEUSSNER, I.; GAY, G.; GRIMWOOD, J.; HOEGGER, P.J.; JAIN, P.; KILARU, S.; LABBE', J.; LIN, Y.C.; LEGUE', V.; LE TACON, F.; MARMEISSE, R.; MELAYAH, D.; MONTANINI, B.;

- MURATET, M.; NEHLS, U.; HIRZEL, H.N.; LE SECQ, M.P.O.; PETER, M.; QUESNEVILLE, H.; RAJASHEKAR, B.; REICH, M.; ROUHIER, N.; SCHMUTZ, J.; YIN, T.; CHALOT, M.; HENRISSAT, B.; KUES, U.; LUCAS, S.; PEER, Y.V.; PODILA, G.K.; POLLE, A.; PUKKILA, P.J.; RICHARDSON, P.M.; ROUZE, P.; SANDERS, I.R.; STAJICH, J.E.; TUNLID, A.; TUSKAN, G.; GRIGORIEV, I.V. The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. **Nature**, v.452, p.88-92, 2008.
- MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathology**, 59:153-163, 1969.
- MENOTTA, M.; AMICUCCI, A.; SISTI, D.; GIOACCHINI, A.M.; STOCCHI, V. Differential gene expression during pre-symbiotic interaction between *Tuber borchii* Vittad. and *Tilia Americana* L. **Current Genetics**, v.46, p.158-165, 2004.
- NEHLS, U.; MIKOLAJEWSKI, S.; ECKE, M.; HAMPP, R. Identification and expression analysis of two fungal cDNA regulated by ectomycorrhiza and fruit body formation. **New Phytologist**, v.144, p.195-202, 1999.
- PETER, M.; COURTY, P.; KOHLER, A.; DELARUELLE, C.; MARTIN, D.; TAGU, D.; FREY-KLETT, P.; DUPLESSIS, S.; CHALOT, M.; PODILA, G. et al. Analysis of expressed sequence tags from the ectomycorrhizal basidiomycetes *Laccaria bicolor* and *Pisolithus microcarpus*. **New Phytologist**, v.159, p.117-129, 2003.
- PETERSON, R.L.; MASSICOTTE, H.B.; MELVILLE, L.H. Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology. **NRC Research Press**. ISBN 0-660-19087-7, 2004.
- RUOSLAHTI, E. RGD and other recognition sequences for integrins. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v.12, p.697-715, 1996.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**, 2. ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis**, 3rd ed. USA: Academic Press, 2008.
- SOUZA, V. C.; SILVA, R. A.; CARDOSO, G. D.; BARRETO, A. F. Studies on mycorrhizal fungi. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.10, p.612-618, 2006.
- SUNDARAM, S.; KIM, S.J.; SUZUKI, H.; MCQUATTIE, C.J.; HIREMAH, S.T.; PODILA, G.K. Isolation and characterization of a symbiosis-regulated ras from the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. **Mol Plant Microbe Interact**, v.14, p.618-628, 2001.

- TAGU, D.; DE BELLIS, R.; BALESTRINI, R.; DE VRIES, O. M. H.; PICCOLI, G.; STOCCHI, V.; BONFANTE, P.; MARTIN, F. Immunolocalization of hydrophobin HYDPt-1 from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius* during colonization of *Eucalyptus globulus* roots. **New Phytologist**, v.149, p.127-135, 2001.
- TAGU, D.; MARTIN, F. Molecular analysis of cell wall proteins expressed during the early steps of ectomycorrhiza development. **New Phytologist**, v.133, n.1, p.73-85, 1996.
- VIEIRA, H.; LIMA, C.; CALZAVARA-SILVA, C.; ACIOLI-SANTOS, B.; MALOSSO, E. The full length *PtSRP* (*Pisolithus tinctorius* symbiosis related protein) fungal mRNA encodes a potential marker of ectomycorrhiza formation. **American Journal of Molecular Biology**, v.2 p.258-264, 2012.
- VOIBLET, C.; DUPLESSIS, S.; ENCELOT, L.; MARTIN, F. Identifications of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. **The Plant Journal**, v.25, p.181-191, 2001.

CAPÍTULO IV

6. IMUNOLocalização DA PtSRP NO FUNGO Ectomicorrízico

Pisolithus tinctorius

Artigo a ser submetido ao periódico Current Microbiology.

RESUMO

Numa ectomicorriza o conhecimento acerca dos genes/proteínas envolvidos na fase pré-simbiótica, período crucial para o completo desenvolvimento da simbiose, ainda é escasso. Recentemente, o gene *PtSRP* (função desconhecida) foi parcialmente caracterizado *in silico* e teve sua expressão confirmada em sistema bacteriano. O nosso objetivo foi a confirmação da expressão da PtSRP em micélio de *P. tinctorius* bem como a observação da sua localização celular via imunolocalização. Para tal, expressou-se a PtSRP com uso do vetor pET21D(+) em sistema procarioto obtenção de Ac conformacionais e desnaturado anti-PtSRP, em coelhos da raça *Oryctolagus curiculus*, imunizados em quatro pulsos/150µg da PtSRP. Após a sangria total dos animais pré-imunizados, cada soro foi coletado sendo os Ac purificados e testados quanto a sua sensibilidade e especificidade no reconhecimento da PtSRP, via *western blot*. A partir do microcultivo em lâmia do *P. tinctorius* (meio MNM sólido), o micélio foi submetido aos testes de imunolocalização de fluorescência e confocal. Para a marcação, foram utilizados os Ac primários conformacionais anti-PtSRP obtidos nos ensaios anteriores e o Ac secundário Alexa Fluor 488 nm Goat anti-rabbit IgG. Para o controle negativo, o micélio foi incubado na ausência do Ac primário anti-PtSRP. Em seguida o micélio foi observado no microscópio de fluorescência Leica DMI 4000B/ objetiva de 63x e os campos analisados de acordo com a dispersão e morfologia das células, sendo as imagens capturadas e digitalizadas pelo acoplamento de um computador à câmera do microscópio. Houve forte marcação da proteína PtSRP ao longo de toda a hifa e foi observado que a PtSRP, especialmente na objetiva de 63x, encontrava-se localizada principalmente na periferia da hifa, mais especificamente na região correspondente a parede celular/membrana. Esses dados reforçam as predições realizadas anteriormente. Na microscopia confocal as imagens adquiridas com a objetiva de 63x (laser 488nm) em óleo de imersão sendo capturadas e digitalizadas através do acoplamento de computador à câmera do microscópio Leica, TCS SP2. Foram observados resultados semelhantes aos da imunofluorescência convencional, sendo a PtSRP mais evidenciada na periferia das hifas, inclusive no grampo de conexão (estrutura típica dos Basidiomycota). Os dados reforçam o potencial dessa proteína em processos de reconhecimento/manutenção da simbiose *P. tinctorius*-*C. sativa* e são coincidentes com localização celular de proteínas fúngicas envolvidas nos processos de formação/reconhecimento das ectomicorrizas, como as SRAPs e as hidrofobinas que têm localização membranar. Estudos adicionais como nocaute gênico ou utilização de RNAs de interferência para o silenciamento/bloqueio do gene *PtSRP* serão fundamentais na compreensão do papel fisiológico da PtSRP na simbiose.

Palavras-chave: Expressão gênica, fungos ectomicorrízicos, gene *PtSRP*.

IMMUNOLocalIZATION OF THE PtSRP PROTEIN IN THE ECTOMYCORRHIZAL FUNGUS *Pisolithus tinctorius*

ABSTRACT

In ectomycorrhiza, Knowledge about the genes/proteins involved in the pre-symbiotic phase, crucial period for full development of symbiosis is still missing. Recently, transcript of PtSRP gene (unknown function) has been *in silico* partially characterized although its protein has not been identified in your original fungus *Pisolithus tinctorius*. Our study was to observe the PtSRP localtization in the *P. tinctorius* fungus in order to confirm the computational data and better understand its participation in the pre-contact phase interaction. To make this, the PtSRP was expressed in procaryotic system with pET21D(+) vector in order to obtain conformational and desnatured antibodies anti-PtSRP, in *Oryctolagus curiculus* rabbits species immunized with four pulses of 150µg of the PtSRP. After the total bleeding, the serum was collected, and the antibodies purified and tested for their sensitivity and specificity in recognition of PtSRP by western blot. Then we performed the *P. tinctorius* microcultive with MNM solid culture medium, and after one month of growth, the mycelium was submitted to immunolocalization and fluorescence confocal tests. The results showed strong labeling of the protein PtSRP throughout the hyphae, including connection clamp (typical structure of Basidiomycota). It was observed that PtSRP, especially in the 63x objective, was located primarily in the periphery of hyphae, and more specifically the region corresponding to the cell wall/membrane, which enhances the prediction data obtained in previous analyzes indicated that membrane localization. In confocal microscopy images were acquired in the plan fluor 63x 1.3 NA objective (oil immersion). Similar results were observed with immunofluorescence, and the PtSRP more evident at the periphery of the hyphae. These data are coincidentes with some fungal protein potentially involved in the recognition and formation processes of the ectomycorrhizal, especially SRAPs and hydrophobins that have membrane localization. Additional studies as gene knockout or interfering RNAs use or silencing of gene expression lock PtSRP are essential in understanding the role of PtSRP at the beginning and formation of symbiosis.

Keywords: gene expression, ectomycorrhizal fungi, PtSRR1.

1. INTRODUÇÃO

A formação das ectomicorrizas se inicia com o reconhecimento dos parceiros desta simbiose através da expressão coordenada de genes e síntese de proteínas específicos de fungos e plantas em associação (PETERSON et al., 2004).

As ectomicorrizinas são um grupo de proteínas fúngica que chamam a atenção dos micorrizologistas por serem tidas como específicas da simbiose (HILBERT et al., 1991). Além das ectomicorrizinas, outras proteínas já foram descritas como participantes desta interação: as hidrofobinas (TAGU et al., 2001; DUPLESSIS et al., 2005; LE QUÉRÉ et al., 2005; ACIOLI-SANTOS et al., 2008) e as SRAPs (symbiosis related acid protein) (LAURENT et al., 1999). Estas últimas são consideradas fortes marcadoras do desenvolvimento da associação ectomicorrízica entre *Pisolithus tinctorius* e *Eucalyptus globulus* (DUPLESSIS et al., 2005).

Com o advento das técnicas moleculares, muitos avanços foram alcançados no que se refere ao entendimento das vias de formação da simbiose (SMITH & READ, 2008), tendo sido possível identificar a expressão de centenas de genes ativados ou reprimidos em determinada fase da associação (LE QUÉRÉ et al., 2005, COELHO et al., 2010).

Muitos destes genes fúngicos, de funções desconhecidas ou ESTs, foram isolados de espécies como *Suillus variegatus*, *Paxillus involutus*, *Tuber borchii*, *Pisolithus microcarpus* em diferentes combinações simbióticas. Estes transcritos foram funcionalmente relacionados a várias atividades celulares, com destaque ao crescimento e organização celular, morfogênese, metabolismo energético, síntese e interação de proteína, transcrição e regulação da tradução, transporte de íons, aminoácidos e peptídeos, a sinalização, proteínas de membrana, processamento de RNA/DNA e defesa celular e apoptose (ACIOLI-SANTOS et al., 2010).

A fase pré-simbiótica, que representa o início da interação e tem importância fundamental na compatibilidade entre os micobiontes, tem sido pouco estudada. A partir de uma biblioteca subtrativa de cDNAs foram identificados os genes diferencialmente expressos (fase pré-simbiótica) na interação de *Hydnangium* sp. em presença de raízes de *Eucalyptus grandis* por exemplo. Estes genes codificavam para proteínas relacionadas a metabolismos e energia, a transcrição e a síntese de proteínas, a comunicação celular, transdução de sinal, resposta ao stress, transposons, e as proteínas relacionadas com a biogênese dos componentes celulares (COELHO et al., 2010).

Noutro estudo envolvendo o sistema *Pisolithus tinctorius*-*Castanea sativa* pesquisadores isolaram parcialmente um novo RNA mensageiro do fungo na fase de pré-contato, num período de 12 horas da associação (ACIOLI-SANTOS et al., 2008). Esse fragmento do gene foi chamado de *PtSRR1* (ACIOLI-SANTOS et al., 2009) e, após obtenção da sua porção 5' restante, passou a ser referido como *PtSRP* (VIEIRA et al., 2012).

Seguiu-se com o aprofundamento das análises da ORF e sua proteína putativa. As análises de predição revelaram que a proteína putativa PtSRP teria pequena massa, cerca de 127 a.a com uma região inicial hidrofóbica transmembranar. Embora houvesse indícios de que este gene estaria relacionado à ectomicorrização, não foi encontrado para o peptídeo traduzido nenhum domínio conservado clássico de proteínas previamente caracterizadas nem de estrutura cristalizada similar em bancos de dados (VIEIRA et al., 2012). Neste contexto, é de fundamental importância a confirmação da existência da PtSRP no fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* bem como a definição de sua localização celular com vistas à elucidação parcial do potencial papel fisiológico desta proteína no desenvolvimento da simbiose.

2. OBJETIVOS

2.2 Objetivo geral

Determinar a potencial localização celular da proteína PtSRP no fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* através de ensaios de imunolocalização e relacionar os dados obtidos com o advento da simbiose.

2.3 Objetivos específicos

- Produzir e purificar os anticorpos específicos anti-PtSRP;
- Imunolocalizar a proteína PtSRP no fungo *P. tinctorius*;
- Relacionar os dados de localização celular ao advento da ectomicorrização, dando ênfase à sua provável função na célula.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microcultivo em lâmina do isolado ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pt-103)

Neste experimento, o microcultivo foi utilizado para a obtenção do micélio com fins na utilização da etapa de imunofluorescência descrita nos próximos tópicos. Assim, o isolado Pt-103 foi previamente cultivado em placas de Petri (9cm de diâmetro) contendo cada, 20 mL de meio sólido Melin-Norkrans Modificado - MNM (MARX, 1969) em incubadoras B.O.D. a 25 ± 1 °C, no escuro, por 1 mês.

O sistema de microcultivo foi montado de acordo com Ribeiro & Soares (2000) e Alcântara et al. (2001). Cada placa de Petri recebeu um tubo em “U” e sobre ele foi fixada uma lâmina de microscopia (**Figura 1**). Com o auxílio de uma alça de platina flambada foi cortado um disco de meio de cultura MNM sólido (5mm de diâmetro) e colocado sobre a lâmina. Em seguida foram retirados fragmentos de micélio do Pt-103 em placas de Petri (descrito anteriormente) e inoculados em quatro cantos do bloco de ágar. A seguir foi colocada uma lamínula esterilizada sobre o bloco de ágar recém semeado e um chumaço de algodão hidrófilo umedecido com água destilada esterilizada foi inserido no sistema. As placas foram incubadas em BOD a 25 ± 1 °C por um mês para que o fungo pudesse se desenvolver sobre a superfície da lâmina e da lamínula.

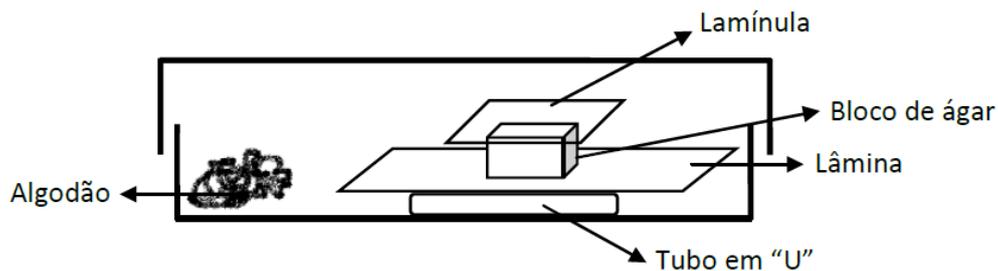


Figura 1. Esquema geral do microcultivo do isolado de *Pisolithus tinctorius* (Pt-103).

3.2 Expressão e purificação da PtSRP

No **Capítulo III** anterior foi realizada a clonagem da ORF do gene PtSRP e a expressão em procarioto de sua proteína recombinante correspondente. Brevemente a

ORF foi amplificada por PCR com o uso de iniciadores adicionados de sítios de restrição para as enzimas EcoR1 e Xho1 a partir de amostras de cDNA do fungo *Pisolithus tinctorius*. Os fragmentos foram clonados em vetor comercial pJET1.2, Fermentas® e a ORF subclonada em vetor de expressão pET21D(+), previamente tratado com as mesmas enzimas. Essa nova construção do vetor foi utilizada para transformar bactérias de expressão BL-21 star. A PtSRP foi expressa em larga escala sob ação do indutor IPTG a 0,1mM e purificada com e sem o uso de ureia. Foram realizadas avaliações por *western blot* através da utilização de anticorpos anti-histidina que reconheceram a cauda de histidina presente na região C-terminal das PtSRPs purificadas. Estas permaneceram congeladas a -20°C para uso na etapa de imunização e obtenção de anticorpos anti-PtSRP descritas com mais detalhes no decorrer deste capítulo.

3.3 Produção de anticorpos policlonais anti-PtSRP com a PtSRP desnaturada e nativa

Com o objetivo de identificar a PtSRP no fungo *Pisolithus tinctorius*, foram produzidos dois tipos de anticorpos específicos anti-PTSRP: os anticorpos conformacionais através da imunização em animais com a proteína nativa e o outro com uso da PtSRP desnaturada purificada com o uso da ureia. Antes de início dos experimentos com os animais o projeto foi submetido ao Comitê de Ética Animal – CEUA da Fiocruz, o qual concedeu a licença de autorização de nº 33/2012. Foram escolhidos 4 coelhos brancos saudáveis da espécie *Oryctolagus curiculus* (**Figura 2 A**), mantidos no biotério do CPqAM/FIOCRUZ, com cerca de 4 meses de idade, sendo dois para a produção de anticorpos conformacionais e dois através da imunização com a proteína desnaturada. Foi realizada a sangria pré-imune na qual o volume de 5 mL de sangue (punção na orelha) foi coletado com a ajuda de uma seringa de insulina (**Figura 2 B**) e deixado a 4°C durante a noite para a coagulação. No dia seguinte, o material coletado foi centrifugado por 10 min./ 2.095×g e o soro utilizado no controle pré-imune.

Para a produção do 1º tipo de anticorpo (conformacional) na primeira imunização, ~150 µg da proteína foram misturados com 200 µL de adjuvante de Freud (Sigma®) na sua forma completa que é um composto formado por uma emulsão oleosa em água contendo micobactérias mortas pela ação do calor ou componentes de sua

parede celular e é efetivo em potencializar resposta imune humoral e celular contra imunógenos co-administrados (**Figura 2 C**). Em seguida essa mistura foi injetada nos coelhos por via intramuscular (**Figura 2 D**). A segunda, a terceira a quarta imunizações foram realizadas 15, 30 e 45 dias após a primeira. Nessas três últimas foi administrado o antígeno adicionado de 200µl do adjuvante de Freud na sua forma incompleta (Sigma®) sem a presença de micobactérias. Sete dias após a terceira imunização foram coletadas amostras de 5 ml de sangue dos coelhos (punção na orelha), para serem avaliadas as quantidades de anticorpos presentes nos sangues coletados pelos métodos *Western blot*. Após confirmação de anticorpos específicos foi feita uma punção cardíaca nos coelhos para a sangria total. O sangue colhido foi deixado a 4°C durante a noite e em seguida centrifugado por 10 min./ 2.095×g. O soro foi aliquoteado e acondicionado a -20°C para uso posterior.

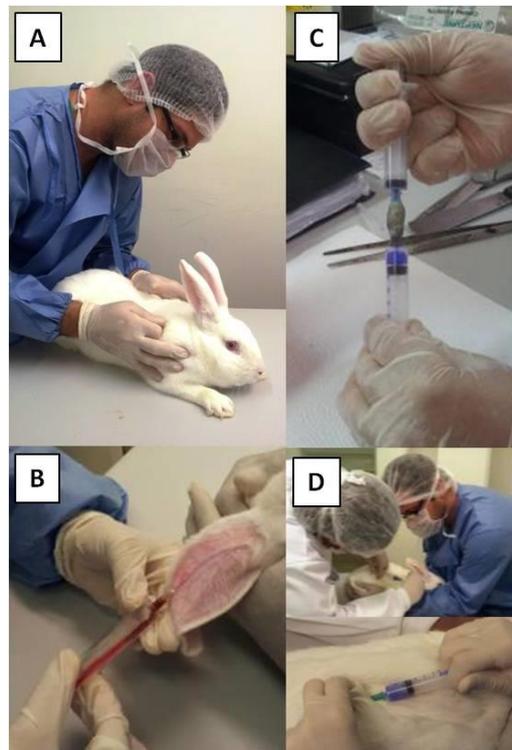


Figura 2. Imunizações para a obtenção do anticorpo anti-PtSRP. (A) *Oryctolagus curiculus*; (B) Coleta da sangria pré-imune; (C) Maceração da PtSRP e (D) Imunização da PtSRP.

Para a produção do 2º tipo de anticorpo (PtSRP desnaturada) na primeira imunização, ~150 µg da proteína foram submetidas a eletroforese SDS-PAGE acrilamida 15%. O gel foi corado com *coomassie blue*, revelado em solução descorante sendo a região contendo a proteínas alvo cortada com bisturi estéril. Os fragmentos do gel contendo cerca de 150 µg da PtSRP foram macerados com 1.8 ml de tampão PBS

1X (Tampão salina fosfato 0.15 M pH 7.2) e 200 µL de adjuvante de Freud na sua forma completa (Sigma). Em seguida essa mistura foi injetada nos coelhos por via intramuscular. A segunda, a terceira e a quarta imunizações foram realizadas 15, 30 e 45 dias após a primeira. Nessas três últimas foi administrado o antígeno adicionado de 200µl do adjuvante de Freud na sua forma incompleta (Sigma). Sete dias após a terceira imunização foram coletadas amostras de 5 ml de sangue dos coelhos (punção na orelha), para serem avaliadas as quantidades de anticorpos presentes nos sangues coletados pelos métodos *Western blot*. Após confirmação de anticorpos específicos foi feita uma punção cardíaca nos coelhos para a sangria total. O sangue colhido foi deixado a 4°C durante a noite e em seguida centrifugado por 10 min./ 2.095×g. Uma alíquota deste soro foi utilizado para a realização de *Western blot* afim de testar a capacidade do anticorpo produzido em reconhecer a PtSRP recombinante.

O soro bruto de cada sangria restante foi purificado, testado novamente por *Western blot* e armazenado a -20°C para uso posterior na identificação da PtSRP no fungo ectomicorrízico com a microscopia de imunofluorescência e confocal.

3.4 Detecção da proteína PtSRP por imunofluorescência e confocal

A partir do microcultivo em lâmina, a lamínula contendo o micélio foi removida cuidadosamente a fim de manter preservadas as estruturas fúngica e posta sobre uma placa de Petri. Com o uso do pipetador, a amostra foi lavada por 2 vezes adicionando-se 1 ml de PBS 1X pH 7.2. Com o uso da pipeta o sobrenadante foi removido e em seguida a amostra foi fixada com Paraformaldeído (PFA) 4% (Diluído em PBS pH 7.2) em T.A. por 60 min. Seguidos de duas lavagens com PBS 1X pH 7.2. A amostra foi incubada a com solução contendo TRITON X-100 a 0,01% por 30 min. e em seguida lavada por duas vezes com PBS 1X pH 7.2. Nesta etapa, o micélio foi bloqueado com PBS 1X pH 7.2 + BSA 0,1% por 30 min. Em seguida a foi incubada por 1 hora a 37°C com o Ac primário em PBS 1X pH 7.2 (Diluição 1:50) e lavada com PBS 1X pH 7.2 por duas vezes. A amostra foi incubada por 1 hora a 37°C com o Ac secundário (Alexa Fluor 488 Goat anti-rabbit IgG (H+L) (2mg/ml) cat.A11008 Lot.53980A, Invitrogen) em PBS 1X pH 7.2 (Diluição de 1:10.000) e lavada com PBS 1X pH 7.2 por 2 vezes. Foi adicionado uma gota de Glicerol - Tampão carbonato/bicarbonato (Glicerol 90%:Tampão 10%) sobre uma lamínula que, em seguida foi posta sobre a lâmina e observada no

microscópio de fluorescência Leica DMI 4000B. Os campos analisados foram escolhidos de acordo com a dispersão e morfologia das células. Todas as imagens foram adquiridas no plano 63x fluor 1.3 NA objetiva (em óleo de imersão) com laser 488nm. As imagens foram capturadas e digitalizadas através do acoplamento de um computador à câmera digital do microscópio Leica DMI 4000B. Na microscopia confocal de fluorescência foi utilizado o microscópio da marca Leica, TCS SP2, na objetiva de 63x (laser de 488 nm) em óleo de imersão. Os campos analisados foram escolhidos de acordo com a dispersão e morfologia das células sendo as imagens capturadas e digitalizadas através do acoplamento de um computador à câmera digital do microscópio Leica, TCS SP2.

4. RESULTADOS

4.1 Imunização de coelhos e avaliação da produção de anticorpos específicos contra a PtSRP por *Western blot*

As proteínas PtSRPs purificadas foram utilizadas para imunizar coelhos sadios num protocolo que segue quatro pulsos de imunização com 150µg/pulso da PtSRP, com intervalos de 15 dias. Sete dias após o quarto pulso, os coelhos foram sacrificados por punção cardíaca e os soros policlonais obtidos a partir do sangue. Os anticorpos obtidos foram avaliados contra a respectiva proteína recombinante que induziram a sua produção através de *Western blot* quanto à sensibilidade e especificidade (**Figuras 3-6**). Como controle negativo da reação foram utilizados o cultivo de *E. coli* não transformada e com o vetor fechado em meio LB líquido. Os extratos foram ressuspensos em tampão 2X Laemmli desnaturante, fracionados em gel 15% de poliacrilamida e transferidos para membrana de nitrocelulose. Após o bloqueio das membranas em solução 5% leite em 1X PBS-0.1%Tween, as membranas foram incubadas com os anticorpos policlonais obtidos (1:2.000) em solução 1% leite em 1X PBS / 0.1% Tween, 1 hora sob agitação, e lavadas 3X (10 minutos cada) em 1X PBS /0.1% Tween. Em seguida, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário (1:10.000) anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (Jackson ImmunoResearch®), 1 hora sob agitação, lavadas 3 vezes e reveladas por quimiluminescência utilizando kit de ECL (Amersham®).

Os nossos resultados revelaram que os anticorpos gerados contra a PtSRP desnaturada foram capazes de reconhecer a respectiva PtSRP expressa em sistema de expressão procarioto (**Figura 3 e 4**) nas diferentes concentrações da proteína: (1) 100ng da PtSRP; (2) 50ng da PtSRP; (3) 25ng da PtSRP; (4) 12.5ng da PtSRP; (5) 6.25ng da PtSRP. Como esperado, os anticorpos não marcaram as amostras controle na fração correspondente (6) B1-21 não transformada e (7) B1-21 com pET21D fechado. Na comparação com o marcador de peso molecular *Precision Plus DNA Ladder*, Biorad foi estimado o tamanho da PtSRP em 16kDa, tal como esperado.

Os anticorpos conformacionais, obtidos pela imunização em coelhos com a proteína nativa também foram capazes de marcar a PtSRP nas diferentes concentrações da mesma. No entanto, a revelação do *Western blot* ficou pouco definida como se

houvesse ligação do anticorpo também com outras moléculas, não só com a PtSRP. Por esta razão, o soro contendo os anticorpos anti-PtSRP passou por um processo de purificação antes da sua utilização nos testes de imunofluorescência.

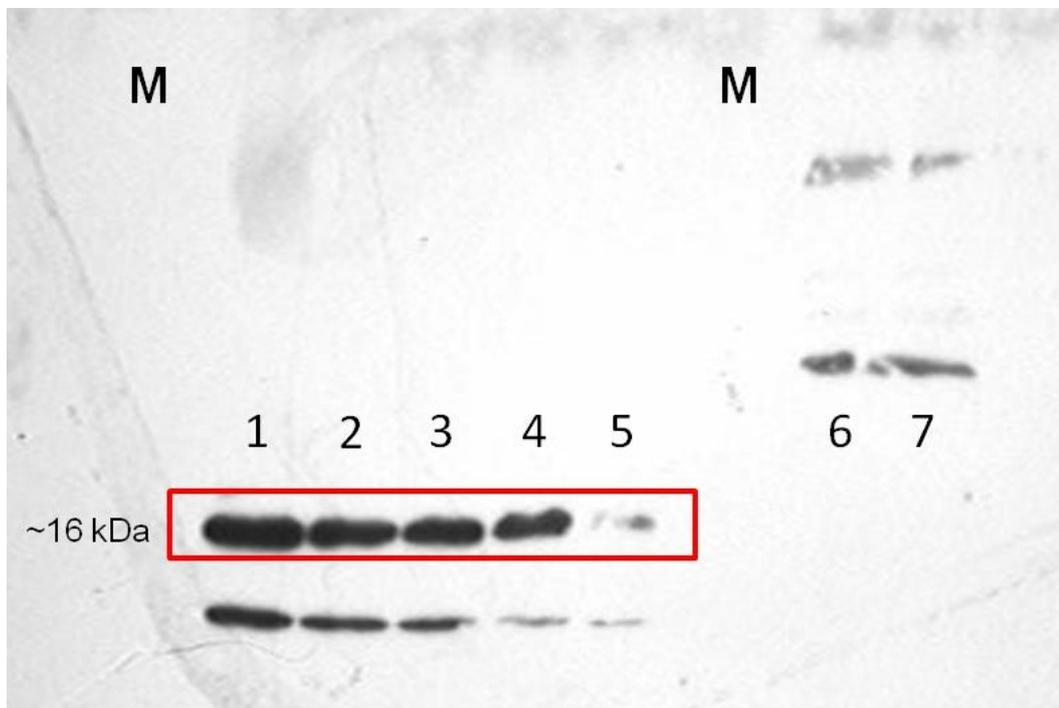


Figura 3. *Western Blot* da avaliação do anticorpo anti-PtSRP em reconhecer a proteína PtSRP (sangria total do coelho 18). Legenda: (M) Marcador molecular Precision Plus DNA Ladder Bio-rad; (1) 100ng da PtSRP; (2) 50ng da PtSRP; (3) 25ng da PtSRP; (4) 12.5ng da PtSRP; (5) 6.25ng da PtSRP; (6) B1-21 não transformada; (7) B1-21 com pET21D fechado. A diluição do anticorpo foi de 1:2.000. As amostras foram fracionadas por eletroforese em gel 15% de poliacrilamida e transferidas para uma membrana de nitrocelulose e depois foi revelado por *western blot*.

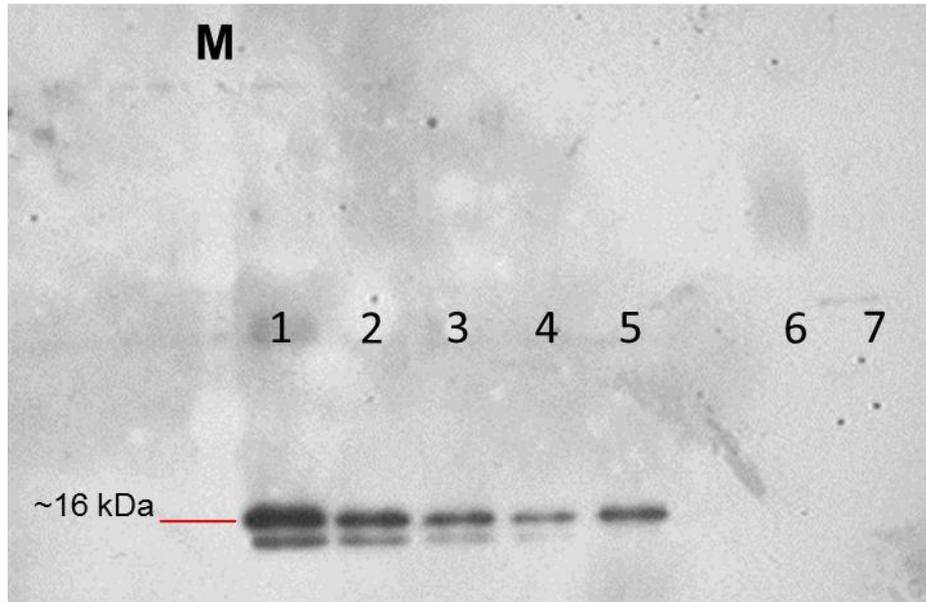


Figura 4. *Western Blot* da avaliação do anticorpo anti-PtSRP em reconhecer a proteína PtSRP (sangria total do coelho 19). Legenda: (M) Marcador molecular Precision Plus DNA Ladder Bio-rad; (1) 100ng da PtSRP; (2) 50ng da PtSRP; (3) 25ng da PtSRP; (4) 12.5ng da PtSRP; (5) 6.25ng da PtSRP; (6) B1-21 não transformada; (7) B1-21 com pET21D fechado. A diluição do anticorpo foi de 1:2.000. As amostras foram fracionadas por eletroforese em gel 15% de poliacrilamida e transferidas para uma membrana de nitrocelulose e depois foi revelado por *western blot*.

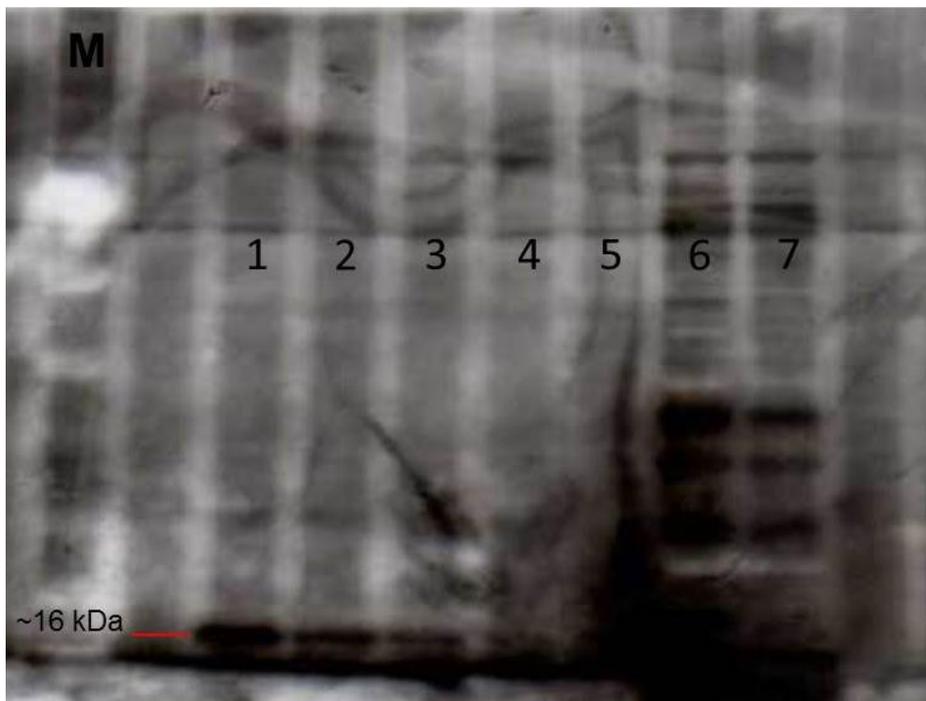


Figura 5. *Western Blot* da avaliação do anticorpo anti-PtSRP em reconhecer a proteína PtSRP (sangria total do coelho 20). Legenda: (M) Marcador molecular Precision Plus DNA Ladder Bio-rad; (1) 100ng da PtSRP; (2) 50ng da PtSRP; (3) 25ng da PtSRP; (4) 12.5ng da PtSRP; (5) 6.25ng da PtSRP; (6) B1-21 não transformada; (7) B1-21 com pET21D fechado. A diluição do anticorpo foi de 1:2.000. As amostras foram fracionadas por eletroforese em gel 15% de poliacrilamida e transferidas para uma membrana de nitrocelulose e depois foi revelado por *western blot*.

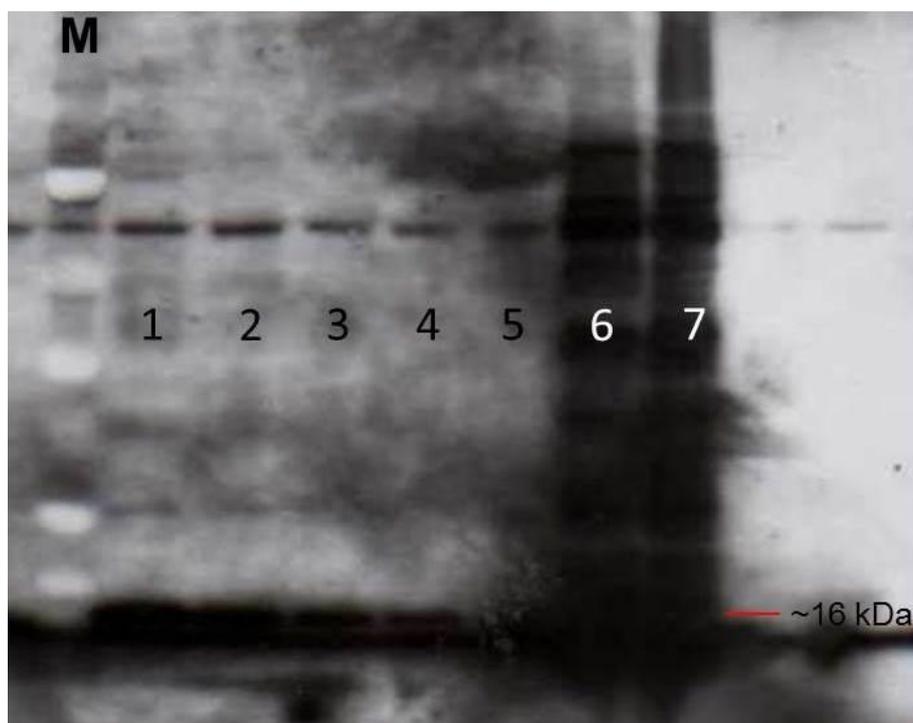


Figura 6. *Western blot* da avaliação do anticorpo anti-PtSRP em reconhecer a proteína PtSRP (sangria total do coelho 21). Legenda: (M) Marcador molecular Precision Plus DNA Ladder Bio-rad; (1) 100ng da PtSRP; (2) 50ng da PtSRP; (3) 25ng da PtSRP; (4) 12.5ng da PtSRP; (5) 6.25ng da PtSRP; (6) B1-21 não transformada; (7) B1-21 com pET21D fechado. A diluição do anticorpo foi de 1:2.000. As amostras foram fracionadas por eletroforese em gel 15% de poliacrilamida e transferidas para uma membrana de nitrocelulose e depois foi revelado por *western blot*.

4.2 Imunolocalização da PtSRP no fungo *Pisolithus tinctorius* através da microscopia de fluorescência

Para esta etapa do experimento foi escolhido utilizar o anticorpo conformacional gerado pela imunização em animais com a proteína nativa já que haveria mais chances deste anticorpo reconhecer a PtSRP *in natura*, no fungo *P. tinctorius*. As imagens geradas pela captação da fluorescência, especialmente na objetiva de imersão (630X), demonstraram que a PtSRP está presente em toda a extensão do micélio de forma abundante (**Figura 7 B**) ao contrário do controle negativo que foi incubado sem o anticorpo primário anti-PtSRP (**Figura 7 A**). Nas demais imagens observa-se a marcação da PtSRP nas regiões periféricas da hifa (**Figura 7 C e D**) mais precisamente da nas regiões correspondentes a parede celular/membrana no fungo *P. tinctorius*.

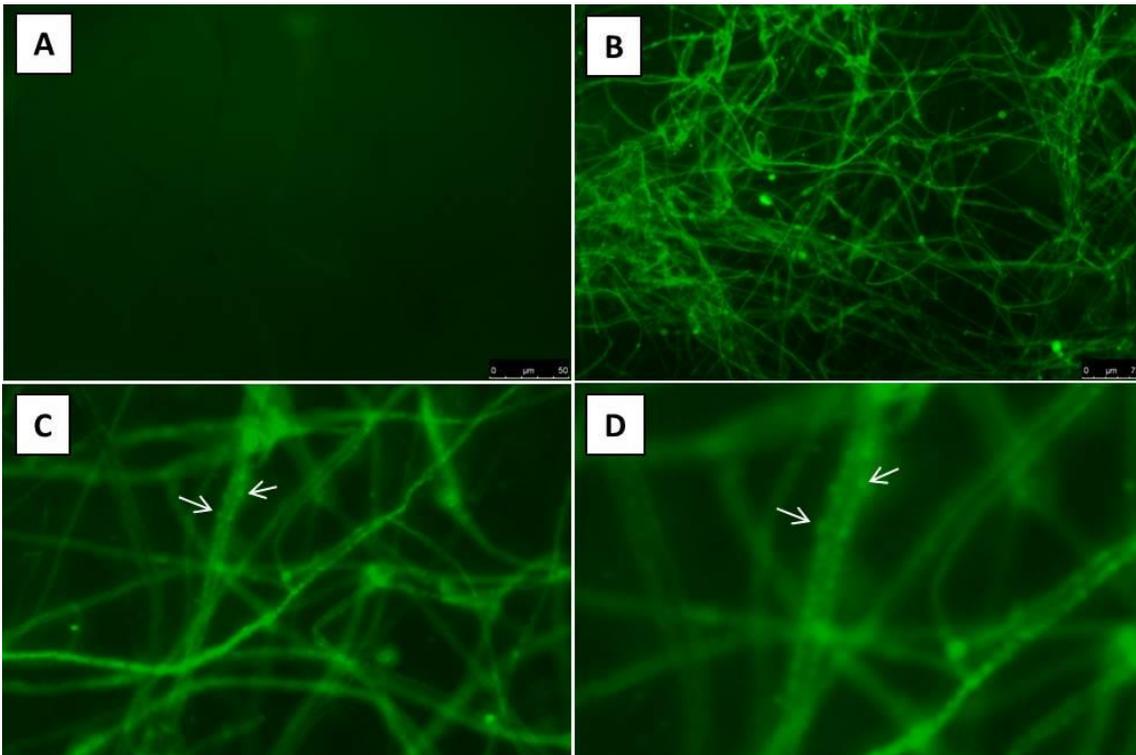


Figura 7. Imunolocalização da PtSRP por fluorescência no fungo *Pisolithus tinctorius*. (A) controle negativo; (B) Plano focal geral do micélio; (C) Ampliação da imagem onde são observadas marcações pontuais da PtSRP na região periférica da hifa (indicadas por setas); (D) detalhe da marcação da PtSRP na região correspondente a membrana/parede celular (setas).

4.3 Imunolocalização da PtSRP no fungo *Pisolithus tinctorius* através da microscopia confocal de fluorescência

Na microscopia confocal de fluorescência ocorre a captação de imagens em diferentes pontos os quais são depois sobrepostos, gerando imagens mais definidas e aumentando a possibilidade de definição de localização celular. Os resultados do controle negativo (micélio incubado na ausência do anticorpo anti-PtSRP) são mostrados nas **Figuras 8 A e B**. Como esperado, não houve a marcação da PtSRP em nenhum plano do controle negativo. Em contrapartida, nas **Figuras 8 C e D** vê-se a amostra em plano focal geral do micélio com a marcação da PtSRP em toda extensão da hifa, inclusive no grampo de conexão, estrutura típica dos Basidiomycota (setas brancas). Nas **Figuras 8 E-F** se tem a sobreposição de duas imagens. Nestas últimas fica evidente a marcação da PtSRP ao longo de todo o micélio sendo observado maior acúmulo da PtSRP na região periférica da hifa onde se localiza a parede celular e membrana plasmática, como indicado por setas pretas.

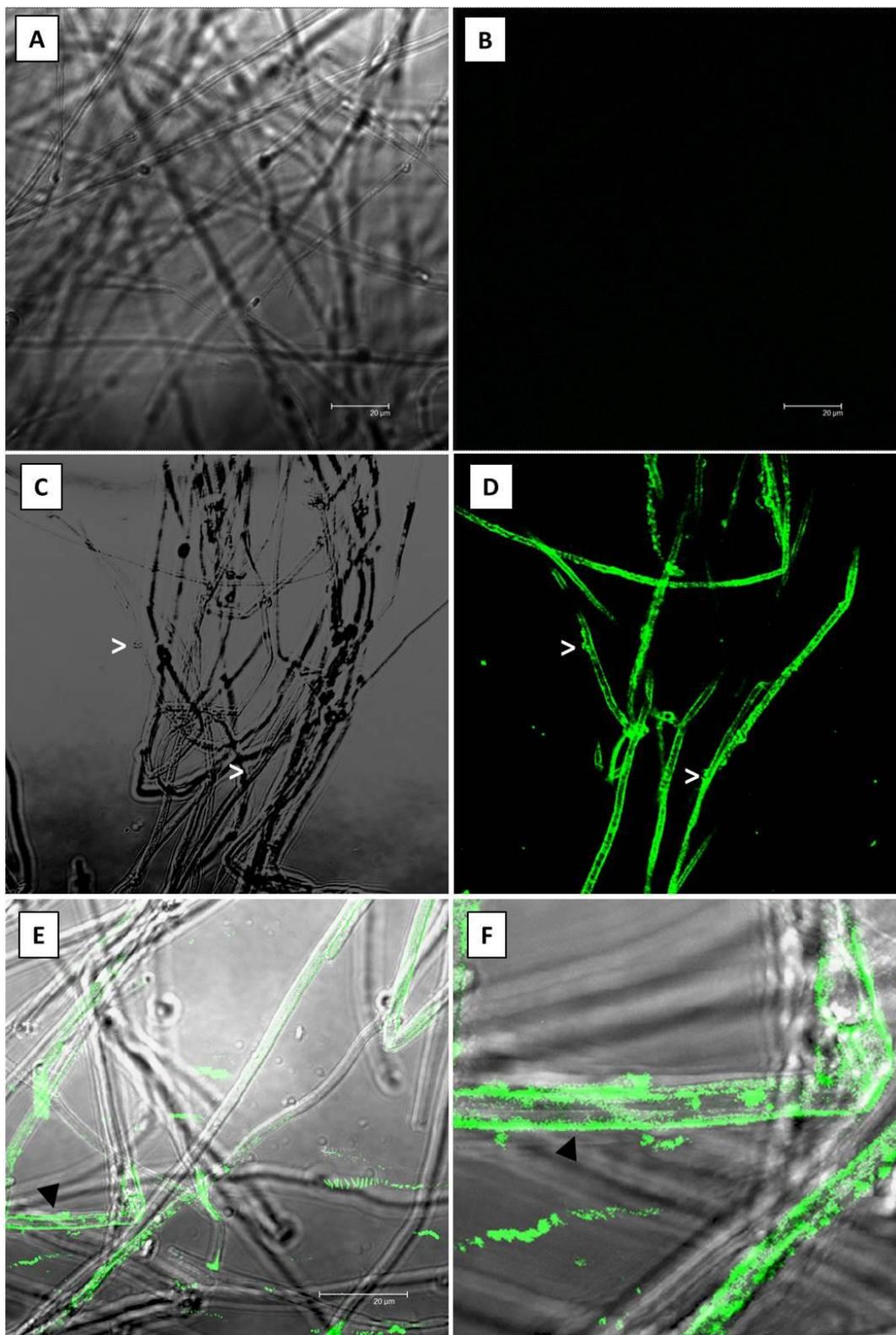


Figura 8. Imunolocalização da PtSRP no fungo *Pisolithus tinctorius* por microscopia confocal de fluorescência. (A e B) controle negativo; (C e D) Plano focal geral do micélio com marcação da PtSRP em toda extensão da hifa inclusive no grampo de conexão (setas brancas); (E e F) Imagens sobrepostas nas quais são observadas marcações da PtSRP ao longo de todo o micélio com maior acúmulo nas regiões da periferia da hifa, na região correspondente a membrana/parede celular (setas pretas).

5. DISCUSSÃO

A ectomicorrização é um processo que implica em transformações morfofisiológicas nos parceiros da interação e, para o completo desenvolvimento mutualista, uma comunicação harmônica deve ser iniciada antes mesmo do primeiro contato e formação das estruturas tipicamente ectomicorrízicas como o manto e a rede de Hartig (SMITH & READ, 2008). Sob esse aspecto, há muito vem se buscando entendimento funcional de genes/proteínas regulados ou que controlam a simbiose ectomicorrízica, muito dos quais de função desconhecida (ACIOLI-SANTOS et al., 2010).

Alguns dos primeiros genes estudados neste aspecto foram as ectomicorrizinas (HILBERT & MARTIN, 1988). Esse grupo de polipeptídeos ácidos encontrados exclusivamente em extratos da ectomicorriza formada por *P. tinctorius-Eucalyptus globulus* foi identificado com expressão diferenciada após 12h da interação simbiótica (HILBERT et al., 1991). As ectomicorrizinas também foram percebidas em outros sistemas de interação (BURGESS et al., 1995; MARTIN et al., 2001) embora sejam consideradas, por alguns pesquisadores, apenas artefatos das técnicas utilizadas (GUTTEMBERGER & HAMPP, 1992).

Com o passar dos anos, entretanto, outros estudiosos demonstraram modificações nos transcritos de genes regulados pela simbiose em diversas interações. Isso abriu novas perspectivas sobre o papel de proteínas cuja função estivesse relacionada potencialmente à simbiose (NEHLS et al., 1999; POLIDORI et al., 2002, COELHO et al., 2010; ACIOLI-SANTOS et al., 2010).

Um desses genes, que vem sendo estudado, é o *PtSRP*, que teve sua ORF predita (ACIOLI-SANTOS et al., 2009) e confirmada em trabalhos anteriores (VIEIRA et al., 2012). A atenção especial dedicada a este gene, em especial, se deve ao fato de ser sobreexpresso na fase de pré-contato (entre 6-12h) entre *P. tinctorius* e *C. sativa* (ACIOLI-SANTOS et al., 2008). Dado que difere fortemente do período de isolamento das ectomicorrizinas descritas por HILBERT & MARTIN, (1988), e que nos leva a crer que estas proteínas podem ter pouca relação com a *PtSRP* (VIEIRA et al., 2012).

Em trabalho anterior, foi realizada a clonagem da ORF do *PtSRP* (vetor de expressão pET21D(+)) em sistema de expressão em procarioto (*E. coli*, Cepa BL-21 Star). Desde então, esta proteína foi expressa, purificada e usada na obtenção de anticorpos policlonais através de imunização em coelhos, para a realização de ensaios

de imunolocalização. Nossos ensaios de imunolocalização da PtSRP, via microscopia de fluorescência e confocal em micélio de *P. tinctorius* crescido em micorcultivo, revelarem que esta proteína encontra-se na porção periférica (membrana/parede celular) das hifas e em toda a extensão do micélio, inclusive na região do grampo de conexão.

Esses dados remetem a outro grupo de proteínas muito estudado em ectomicorrizas, por serem reguladas pela simbiose em sistemas com *P. tinctorius*: as SRAPs (*symbiosis regulated acid proteins*), codificadas por parte de uma família multi-gênica de proteínas de parede celular. Tal como observado para a PtSRP, as SRAPs estão presentes de forma abundante na superfície celular fúngica e foram detectadas através de várias técnicas (inclusive imunolocalização). Possivelmente, as SRAPs fazem parte do sistema de adesão célula-à-célula e agregação das hifas, sendo normalmente identificadas na formação de ectomicorrizas entre *P. tinctorius* e *E. globulus* (LAURENT et al., 1999). Transcritos deste gene foram citados no 4º dia do desenvolvimento da simbiose entre *P. microcarpus*-*E. globulus*, expressão que, segundo alguns autores, serve como bom marcador da micorrização. Embora esse padrão de expressão seja variável dependendo, dos parceiros envolvidos, e não se tenha encontrado registros desses mRNAs para curtos intervalos de tempo (VOIBLET et al., 2001; DUPLESSIS et al., 2005) como vistos para o gene *PtSRP*.

Outro dado interessante é definido pelas análises de hidrofobicidade da PtSRP, que destacam sua região inicial hidrofóbica (VIEIRA et al., 2012) e remete para um segundo grupo de proteínas isoladas também em fungos ectomicorrízicos: as hidrofobinas. Assim como a PtSRP, esses peptídeos possuem pequena massa, sendo secretadas por fungos ou presentes nas paredes celulares das hifas, características importantes na sua interação entre os micobiontes e seus hospedeiros. Algumas hidrofobinas do tipo 1 e 2 (ESTs hydPt1 e hydPt2 e hydPt3) foram descritas como sobreexpressas nos estádios iniciais da interação entre *P. tinctorius*-*E. globulus* (TAGU et al., 1996, 2001, 2002), porém nenhum desses dados se mostrou compatível com o tempo de 6-12 horas encontrado para a PtSRP. Duplessis et al. (2005) também identificaram a sobreexpressão desses genes no fungo *P. microcarpus* com o mesmo hospedeiro para o 4º dia de contato (hydPt2 e hydPt3), embora tenha-se visto repressão para a hidrofobina (tipo 3) até 12 dias de desenvolvimento. Esses dados são contraditórios com a expressão de hidrofobinas em *P. tinctorius* associado a *C. sativa*. mRNAs de homólogos das hydPt2 e 3 que tiveram transcrição fortemente reprimida às 12h de interação (ACIOLI-SANTOS et al., 2008).

Esse aumento da expressão tanto de hidrofobinas quanto das SRAPs nas fases iniciais da formação de ectomicorrizas sugere importante participação em eventos morfogénéticos relacionados com a adesão às superfícies radiculares (SMITH & READ, 2008) e talvez seja indício do papel da PtSRP no desenvolvimento e formação da simbiose. Recentemente, foi visto que na simbiose com *Laccaria bicolor*, várias hidrofobinas podem formar uma subclasse de pequenas proteínas durante a formação da interface simbiótica com células de raiz. Em algumas linhagens de *L. bicolor* essas proteínas pertencem a uma grande família de genes (de 9 e 12 genes) de hidrofobinas de Classe I. O perfil de expressão destes genes está diretamente relacionado ao estágio de vida, devido à suposta vantagem selectiva dada ao fungo na colonização de vasta gama hospedeira (PLETT et al., 2012).

Na resposta do fungo ao estímulo do hospedeiro foi visto que o gene *MiSSP7* (*Mycorrhizal induced Small Secreted Protein 7*) codifica uma proteína efetora de 68 a.a indispensável para o estabelecimento de mutualismo. A MiSSP7 é secretada por *L. bicolor* após a recepção dos sinais difusíveis a partir das raízes de plantas. Em seguida a proteína é importada para dentro da célula vegetal por endocitose mediada pelo fosfatidilinositol 3 fosfato, e encaminhada para o núcleo, onde altera o transcriptoma da célula. Estudo dos domínios funcionais da MiSSP7 revelou a presença do domínio funcional RALG responsável pela entrada na célula vegetal (complexado a outras proteínas) (PLETT et al., 2011). Embora PtSRP seja possivelmente secretada pelo fungo tal como a MiSSP7, a proteína de *P. tinctorius* não apresenta este domínio.

A obtenção de anticorpos anti-PtSRP e a respectiva imunolocalização da proteína no fungo ectomicorrízico *P. tinctorius* abrem novas perspectivas no entendimento da PtSRP no advento da simbiose. Faz-se necessário estudos adicionais da PtSRP, como o silenciamento do gene, bloqueio por nocaute ou uso de iRNA, estudos de imunoprecipitação e interação proteica para entendermos a real função da PtSRP no advento da simbiose.

6. CONCLUSÕES

- A imunização de coelhos (*Oryctolagus curiculus*) com a PtSRP nativa e desnaturada foi capaz de gerar resposta imunogênica eficaz, permitindo a produção de anticorpos policlonais anti-PTSRP;
- Os anticorpos anti-PtSRP da proteína purificada sob condição nativa e desnaturada foram capazes de reconhecer a proteína PtSRP pela técnica de *Western blot*;
- Anticorpos conformacionais são eficazes na imunolocalização da PtSRP em micélio de *Pisolithus tinctorius* por microscopia de fluorescência e confocal;
- A PtSRP é distribuída ao longo de toda a hifa de *P. tinctorius*, especialmente nas regiões periféricas da parede e/ou membrana célula.

REFERÊNCIAS

- ACIOLI-SANTOS, B.; MALOSSO, E.; CALZAVARA-SILVA, C.E.; LIMA, C.E.P.; FIGUEIREDO, A.; SEBASTIANA, M.; PAIS, M.S. *PtSRRI*, a putative *Pisolithus tinctorius* symbiosis related receptor gene is expressed during the first hours of mycorrhizal interaction with *Castanea sativa* roots. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.40(2), p. 292-295, 2009.
- ACIOLI-SANTOS, B.; SEBASTIANA, M.; PESSOA, F.; SOUSA, L.; FIGUEIREDO, A.; FORTES, A.M.; BALDE, A.; MAIA, L.C.; PAIS, M.S. Fungal Transcript Pattern During the Preinfection Stage (12 h) of Ectomycorrhiza Formed Between *Pisolithus tinctorius* and *Castanea sativa* Roots, Identified Using cDNA Microarrays. **Current Microbiol**, v.57, p.620-625, 2008.
- ACIOLI-SANTOS, B.; VIEIRA, H.E.E.; LIMA, C.E.P.; MAIA, L.C. The Molecular Ectomycorrhizal Fungus Essence In Association: A Review Of Differentially Expressed Fungal Genes During Symbiosis Formation. In: Eds. M.K. Rai and A.K. Varma. (Org.). **Diversity and Biotechnology of Ectomycorrhiza**. 1Ed. New York: Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 2010.
- ALCÂNTARA, F.; CUNHA, M.A.; ALMEIDA, M.A. **Microbiologia: práticas laboratoriais**. 2ª ed. Aveiro: Universidade de Aveiro, 297p, 2001.
- BURGESS, T.; LAURENT, P.; DELL, B.; MALAJCZUK, N.; MARTIN, F. Effect of fungal-isolate aggressivity on the biosynthesis of symbiosis-related polypeptides in differentiating eucalypt ectomycorrhizas. **Planta**, v.195, p.408-417, 1995.
- COELHO, I.S.; QUEIROZ, M.V.; COSTA, M.D.; KASUYA, M.C.M., ARAÚJO, E.F. Identification of differentially expressed genes of the fungus *Hydnangium* sp. during the pre-symbiotic phase of the ectomycorrhizal association with *Eucalyptus grandis*. **Mycorrhiza**, v. 20, p.531-540, 2010.
- DUPLESSIS, S.; COURTY, P.; TAGU, D.; MARTIN, F. Transcript patterns associated with ectomycorrhiza development in *Eucalyptus globulus* and *Pisolithus microcarpus*. **New Phytologist**, v.165, p.599-611, 2005.
- GUTTENBERGER, M.; HAMPP, R. Ectomycorrhizins - symbiosis-specific or artifactual polypeptides from ectomycorrhizas. **Planta**, v.188, p.129-136, 1992.

- HILBERT, J.L.; COSTA, G.; MARTIN, F. Ectomycorrhizin syntesis and polypeptide changes during the early stage of eucalypt mycorrhiza development. **Plant Physiology**, v.97, p.977-984, 1991.
- HILBERT, J.L.; MARTIN, F. Regulation of gene expression in ectomycorrhizas. I. Protein changes and the presence of the ectomycorrhiza-specific polypeptides in the *Pisolithus-Eucalyptus* symbiosis. **New Phytologist**, v.110, p.339-346, 1988.
- LAURENT, P.; VOIBLET, C.; TAGU, D.; CARVALHO, D.; NEHLS, U.; DE BELLIS, R.; BALESTRINI, R.; BAUW, G.; BONFANTE, P.; MARTIN, F. A novel class of ectomycorrhiza-regulated cell wall polypeptides in *Pisolithus tinctorius*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.12, n.10, p.862-871, 1999.
- LE QUÉRÉ, A.; WRIGHT, D. P.; SÖDERSTRÖM, B.; TUNLID, A.; JOHANSSON, T. Global patterns of gene regulation associated with the development of ectomycorrhiza between birch (*Betula pendula* Roth.) and *Paxillus involutus*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.18, p.659-673, 2005.
- MARTIN, F.; DUPLESSIS, S.; DITENGOU, F.; LAGRANGE, H.; VOIBLET, C.; LAPEYRIE, F. Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signal and communication genes. **New Phytologist**, v.151, p.145-154, 2001.
- MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathology**, 59:153-163, 1969.
- NEHLS, U.; MIKOLAJEWSKI, S.; ECKE, M.; HAMPP, R. Identification and expression analysis of two fungal cDNA regulated by ectomycorrhiza and fruit body formation. **New Phytologist**, v.144, p.195-202, 1999.
- PETERSON, R.L.; MASSICOTTE, H.B.; MELVILLE, L.H. Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology. **NRC Research Press**. ISBN 0-660-19087-7, 2004.
- PLETT, J.M.; GIBON, J.; KOHLER, A.; DUFFY, K.; HOEGGER, P.J.; VELAGAPUDI, R.; HAN, J.; KÜES, U.; GRIGORIEV, I.V.; MARTIN, F. Phylogenetic, genomic organization and expression analysis of hydrophobin genes in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. **Fungal Genetics and Biology**, v.49, p. 199–209, 2012.
- PLETT, J.M.; KEMPPAINEN, M.; KALE, S.D.; KOHLER, A.; LEGUÉ, V.; BRUN, A.; TYLER, B.M.; PARDO, A.G.; MARTIN, F. A Secreted Effector Protein of *Laccaria bicolor* Is Required for Symbiosis Development. **Current Biology**, v. 21, p.1197-1203, 2011.

- POLIDORI, E.; AGOSTINI, D.; ZEPPA, S.; POTENZA, L.; PALMA, F.; SISTI, D.; STOCCHI, V. Identification of differentially expressed cDNA clones in *Tilia platiphyllos-Tuber borchii* ectomycorrhizae using a differential screening approach. **Molecular Genetics and Genomics**, v.266, p.858-864, 2002.
- RIBEIRO, M. C.; SOARES, M.M.S.R. **Microbiologia Prática: roteiro e manual**. Editora Atheneu: São Paulo, 112p, 2000.
- SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis**, 3rd ed. USA: Academic Press, 2008.
- TAGU, D.; DE BELLIS, R.; BALESTRINI, R.; DE VRIES, O. M. H.; PICCOLI, G.; STOCCHI, V.; BONFANTE, P.; MARTIN, F. Immunolocalization of hydrophobin HYDPt-1 from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius* during colonization of *Eucalyptus globulus* roots. **New Phytologist**, v.149, p.127-135, 2001.
- TAGU, D.; MARMEISSE, R.; BAILLET, Y.; RIVIERE, S.; PALIN, B.; BERNARDINI, F.; MEREAU, A.; GAY, G.; BALESTRINI, R.; BONFANTE, P.; MARTIN, F. Hydrophobins in ectomycorrhizas: heterologous transcription of the *Pisolithus* HydPt-1 gene in yeast and *Hebeloma cylindrosporum*. **European journal histochemistry**, v.46, n.1, p.23-29, 2002.
- TAGU, D.; MARTIN, F. Molecular analysis of cell wall proteins expressed during the early steps of ectomycorrhiza development. **New Phytologist**, v.133, n.1, p.73-85, 1996.
- VIEIRA, H.; LIMA, C.; CALZAVARA-SILVA, C.; ACIOLI-SANTOS, B.; MALOSSO, E. The full length *PtSRP* (*Pisolithus tinctorius* symbiosis related protein) fungal mRNA encodes a potential marker of ectomycorrhiza formation. **American Journal of Molecular Biology**, v.2 p.258-264, 2012.
- VOIBLET, C.; DUPLESSIS, S.; ENCELOT, L.; MARTIN, F. Identifications of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. **The Plant Journal**, v.25, p.181-191, 2001.

7. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

Nas condições experimentais descritas neste trabalho foi possível realizar algumas etapas importantes para o estudo do novo gene *PtSRP*, sendo confirmado a sua sequência a partir de amostras de DNA do fungo *P. tinctorius*, feita a clonagem de sua ORF mais provável com expressão e purificação de sua proteína *PtSRP* além da imunolocalização em micélio de *P. tinctorius*.

Os dados de microscopia de fluorescência e confocal, que indicaram a *PtSRP* na região periférica da hifa corroboram a hipótese de que esta proteína seria membrana e/ou de parede celular, sendo potencialmente relacionada à sinalização/formação da ectomicorriza nos estádios iniciais da interação. No entanto, ainda há um longo caminho a ser percorrido no entendimento definitivo da função desta proteína durante a associação do fungo com o hospedeiro. Estudos adicionais como o nocaute gênico, o uso de RNA de interferência ou técnicas para o bloqueio e/ou silenciamento do gene *PtSRP* são cruciais para desvendar a real função desta proteína nas fases iniciais de interação e formação da simbiose ectomicorrízica.