

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

FELIPE TAVARES LIMA

**PERMEABILIZAÇÃO DA PAREDE CELULAR DE BASIDIÓSPOROS DE
Pisolithus microcarpus POR AGENTES QUÍMICOS E ENZIMÁTICOS**

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

FELIPE TAVARES LIMA

**PERMEABILIZAÇÃO DA PAREDE CELULAR DE BASIDIÓSPOROS DE
Pisolithus microcarpus POR AGENTES QUÍMICOS E ENZIMÁTICOS**

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

Orientador: Maurício Dutra Costa

Coorientadoras: Marisa Vieira de Queiroz
Valéria Monteze Guimarães

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

L732p
2022
Lima, Felipe Tavares, 1993-
Permeabilização da parede celular de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* por agentes químicos e enzimáticos / Felipe Tavares Lima. - Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (62 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Maurício Dutra Costa.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, 2022.
Referências bibliográficas: f. 54-62.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.256>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Fungos - Cultura e meios de cultura. 2. Simbiose.
3. Fertilização *in vitro*. 4. Enzimas. 5. *Pisolithus sp.* I. Costa, Maurício Dutra, 1966-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 579.51785

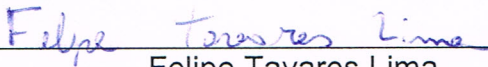
FELIPE TAVARES LIMA

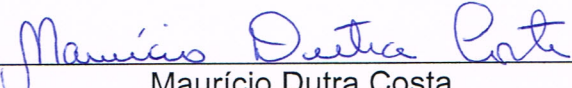
**PERMEABILIZAÇÃO DA PAREDE CELULAR DE BASIDIÓSPOROS DE
Pisolithus microcarpus POR AGENTES QUÍMICOS E ENZIMÁTICOS**

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

APROVADA: 28 de abril de 2022.

Assentimento:


Felipe Tavares Lima
Autor


Maurício Dutra Costa
Orientador

Aos meus pais, irmãs, avós, companheiro e todos que contribuem e torcem por meu sucesso e felicidade, com amor dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, por terem se esforçado e me dado a melhor educação que puderam, permitindo que eu tenha a confiança e as ferramentas necessárias para alcançar meus objetivos. Agradeço também a compreensão, apoio e as demonstrações de orgulho e admiração durante minha jornada acadêmica, mesmo que não seja exatamente o caminho que sonharam para mim.

À minha irmã Mariana, pela falta de julgamento moral, acolhimento, cumplicidade e doçura, principalmente nos momentos mais difíceis.

À minha irmã Juliana, por ter compartilhado a infância comigo, sendo, mesmo após anos de distância, capaz de me compreender e prestar um tipo raro de apoio. Também, por dividir as responsabilidades familiares que nos cabem.

Aos meus amigos, em especial a Pedro, Alanna e Luna, por se fazer presentes em todos os momentos, mostrando-se uma verdadeira e amorosa segunda família, e à Helena e ao Emanuel, por fazerem minha acolhida em uma cidade nova e em meio à pandemia.

Ao meu companheiro João Pedro, por apoiar e cuidar de mim desde que nos conhecemos.

À Rita e Bao, pela companhia e pelo amor constantes.

À toda equipe do Laboratório de Ecologia Microbiana, pelo carinho, pelo companheirismo e pelo melhor acolhimento que já recebi por parte de companheiros de laboratório.

Às equipes dos Laboratórios de Genética Molecular de Fungos, de Análises Bioquímicas e de Microbiologia Ambiental Aplicada, por se mostrarem dispostos a ajudar e preocupados com o sucesso dos meus experimentos.

Ao meu orientador, Maurício, pelo tempo, conhecimento, dedicação e preocupação empenhados.

Às minhas coorientadoras, Marisa e Valéria, pelas contribuições essenciais e por serem grandes inspirações profissionais.

À equipe de trabalhadores do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), por manterem o ambiente em funcionamento, limpo e adequado para o desenvolvimento de pesquisa.

Às pessoas que compõem o Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da UFV, incluindo a coordenação, os docentes, discentes e a secretária Letícia, pelas excelentes oportunidades e formação que me foram ofertados mesmo em um momento tão desafiador.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

E a todos os demais que contribuíram direta ou indiretamente para meu bem-estar e a realização da conquista representada por este trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Se não entrarmos em comunhão e compreensão com os organismos que nos sustentam hoje, não apenas destruiremos esses organismos, mas nos destruiremos.”

Paul Stamets

BIOGRAFIA

Felipe Tavares Lima, filho de Inez Tavares Lima e José André de Arruda Lima, nasceu em 12 de agosto de 1993 em Recife, Pernambuco. Iniciou sua graduação em Engenharia Florestal pela Universidade Federal Rural de Pernambuco em fevereiro de 2015, concluindo o curso em dezembro de 2019. Em março de 2020, ingressou na Universidade Federal de Viçosa através do mestrado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, defendendo sua dissertação em abril de 2022.

RESUMO

LIMA, Felipe Tavares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2022. **Permeabilização da parede celular de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* por agentes químicos e enzimáticos.** Orientador: Maurício Dutra Costa. Coorientadoras: Marisa Vieira de Queiroz e Valéria Monteze Guimarães.

Pisolithus é gênero fúngico com espécies capazes de formar associações simbióticas ectomicorrízicas com grupos florestais de alto valor econômico, a exemplo dos pinhos e eucaliptos. A germinação *in vitro* de basidiósporos de *Pisolithus* é baixa, inviabilizando o uso desse material como inoculantes comerciais e dificultando a obtenção de isolados monocarióticos, importantes para estudos genéticos. A impermeabilidade da parede celular, observada em esporos maduros, pode ser responsável pela baixa porcentagem de germinação *in vitro*. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver método de permeabilização da parede celular de basidiósporos de *P. microcarpus* com agentes químicos e enzimas visando à manutenção da viabilidade desses propágulos. Foram testados como agentes permeabilizadores Triton X-100, ácido metanoico, hidróxido de sódio e os coquetéis enzimáticos comerciais Lysing Enzymes e Driselase, em diferentes concentrações e tempos de incubação. NaOH nas concentrações de 100, 250, 500 e 1000 mmol L⁻¹ mostrou-se eficaz na remoção de pigmentos e proteínas, resultando na permeabilização dos basidiósporos sem perda de viabilidade. O melhor tratamento foi com NaOH a 1000 mmol L⁻¹ por um minuto, permeabilizando 97 % dos basidiósporos. A permeabilização com NaOH mostrou-se reprodutível quando aplicada a basidiósporos oriundos de 9 áreas de coleta distintas. As enzimas líticas não foram capazes de permeabilizar os esporos quando aplicadas isoladamente. No entanto, após o tratamento prévio dos basidiósporos com NaOH, Lysing Enzymes aumentou significativamente as porcentagens de permeabilização quando aplicadas nas concentrações de 30 e 60 mg mL⁻¹. O método desenvolvido tem potencial para melhorar as porcentagens de germinação dos basidiósporos de *P. microcarpus*, facilitando a obtenção de estirpes monocarióticas e o desenvolvimento de inoculantes ectomicorrízicos.

Palavras-chave: Ectomicorriza. Germinação. Enzimas líticas.

ABSTRACT

LIMA, Felipe Tavares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2022. **Permeabilization of the cell wall of *Pisolithus microcarpus* basidiospores by chemical and enzymatic agents.** Advisor: Maurício Dutra Costa. Co-advisors: Marisa Vieira de Queiroz and Valéria Monteze Guimarães.

Pisolithus is a fungal genus with species capable of forming symbiotic ectomycorrhizal associations with forest groups of high economic value, such as pines and eucalyptus. *In vitro* germination rates of *Pisolithus* basidiospores are low, making the use of this material as commercial inoculants unfeasible and making it difficult to obtain monokaryotic isolates, which are important for genetic studies. The impermeability of the cell wall, observed in mature basidiospores, may be responsible for the low *in vitro* germination percentages. The objective of the present work was to develop a method for permeabilizing the cell wall of *P. microcarpus* basidiospores with chemical agents and enzymes maintaining the viability of these propagules. Triton X-100, methanoic acid, sodium hydroxide and the commercial enzymatic cocktails Lysing Enzymes and Driselase were tested as permeabilizing agents at different concentrations and incubation times. NaOH at concentrations of 100, 250, 500 and 1000 mmol L⁻¹ proved to be effective in removing pigments and proteins, resulting in basidiospore permeabilization without loss of viability. The best treatment corresponded to NaOH at 1000 mmol L⁻¹ for one minute, permeabilizing 97% of the basidiospores. Permeabilization with NaOH proved to be reproducible when applied to basidiospores from 9 different collection areas. The lytic enzymes were not able to permeabilize the spores when applied alone. However, after pretreatment of the basidiospores with NaOH, Lysing Enzymes significantly increased the permeabilization percentages when applied at concentrations of 30 and 60 mg mL⁻¹. The method developed herein has the potential to improve the germination percentages of *P. microcarpus* basidiospores, facilitating the obtention of monokaryotic strains and the development of ectomycorrhizal inoculants.

Keywords: Ectomycorrhiza. Germination. Lytic enzymes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Teores de pigmento no sobrenadante após o tratamento de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* com Triton X-100 a diferentes concentrações e tempos de incubação a 35 °C. A concentração de pigmentos está expressa em valores de absorbância medidos a 350 nm. Ao lado de cada concentração de Triton X-100 testada consta a equação de regressão ajustada, considerando apenas os modelos significativos.34
- Figura 2.** Teores de pigmento no sobrenadante após o tratamento de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* com Triton X-100 a diferentes concentrações e tempos de incubação a 35 °C. A concentração de pigmentos está expressa em valores de absorbância medidos a 475 nm. Ao lado de cada concentração de Triton X-100 testada consta a equação de regressão ajustada, considerando apenas os modelos significativos.34
- Figura 3.** Concentração de proteína no sobrenadante após o tratamento de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* com Triton X-100 a diferentes concentrações e tempos de incubação a 35 °C.35
- Figura 4.** Percentual de permeabilização de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* tratados com Triton X-100 a diferentes concentrações e tempos de incubação a 35 °C.35
- Figura 5.** Concentração de proteína no sobrenadante após o tratamento de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* com ácido metanoico a diferentes concentrações e tempos de incubação à temperatura ambiente.37
- Figura 6.** Concentração de proteína no sobrenadante após tratamentos de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* em função da concentração de ácido metanoico. Equação de regressão representativa de modelo quadrático significativo ajustado aos dados.37
- Figura 7.** Percentual de permeabilização de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* tratados com metanoico a diferentes concentrações e tempos de incubação à temperatura ambiente.38
- Figura 8.** Teores de pigmento no sobrenadante após o tratamento de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* com NaOH a diferentes concentrações e tempos de incubação a temperatura ambiente. A concentração de pigmentos está expressa em valores de absorbância medidos a 350 nm. Ao lado de cada concentração de NaOH testada consta a equação de regressão ajustada, considerando apenas os modelos significativos.38

- Figura 9.** Concentração de proteína no sobrenadante após o tratamento de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* com NaOH a diferentes concentrações e tempos de incubação a temperatura ambiente.40
- Figura 10.** Concentração de proteína no sobrenadante após tratamentos de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* em função da concentração de NaOH. Equação de regressão representativa de modelo quadrático significativo ajustado aos dados.40
- Figura 11.** Basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* corados com Sudan Black B após permeabilização com diferentes concentrações de NaOH por 1 minuto. (A) 1000 mmol L⁻¹. (B) 500 mmol L⁻¹. (C) 250 mmol L⁻¹. (D) 100 mmol L⁻¹. (E) 50 mmol L⁻¹. (F) Controle: 0 mmol L⁻¹. Barras: 20 µm.41
- Figura 12.** Percentual de permeabilização de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* tratados com NaOH a diferentes concentrações e tempos de incubação à temperatura ambiente.42
- Figura 13.** Percentual de permeabilização de basidiósporos de *P. microcarpus* após tratamentos, em função da concentração de NaOH. Equação de regressão representativa de modelo quadrático significativo ajustado aos dados.42
- Figura 14.** Percentual de basidiósporos de *P. microcarpus* permeabilizados sequencialmente com NaOH a 500 mmol L⁻¹ por um min, Triton X-100 a 1 % por 60 min (T) e ácido metanoico a 5 % por 1 min (A), em diferentes ordens. ns = não significativo pelo teste de Tukey a 5%.43
- Figura 15.** Percentual de basidiósporos de *P. microcarpus* permeabilizados com NaOH a diferentes concentrações e, posteriormente, submetidos à digestão com Lysing Enzimes (LE; 15 mg mL⁻¹), Driselase (Dr; 15 mg mL⁻¹) e LE + Dr (15 mg mL⁻¹ + 15 mg mL⁻¹). Controle = tratamento dos basidiósporos somente com NaOH na concentração correspondente. ns = não significativo pelo teste de Tukey a 5%45
- Figura 16.** Percentual de basidiósporos de *P. microcarpus* permeabilizados com NaOH a diferentes concentrações e, posteriormente, submetidos à digestão com Lysing Enzimes (LE; 30 mg mL⁻¹). Controle: tratamento dos basidiósporos somente com NaOH na concentração correspondente. * = significativo pelo teste de Tukey a 5%. ns = não significativo.45
- Figura 17.** Percentual de basidiósporos de *P. microcarpus* permeabilizados com NaOH a diferentes concentrações e, posteriormente, submetidos à digestão com Lysing Enzimes (LE; 60 mg mL⁻¹). Controle: tratamento dos basidiósporos somente com NaOH na concentração correspondente. * = significativo pelo teste de Tukey a 5%. ns = não significativo.46

Figura 18. Porcentagem de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* permeabilizados, oriundos de 9 áreas de coleta distintas, após tratamento com NaOH a 500 mmol L⁻¹ e incubados por um minuto à temperatura ambiente. Barras com a mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.46

Figura 19. Basidiósporos de *P. microcarpus* submetidos a coloração com kit LIVE/DEAD™ FungaLight™ Yeast Viability. Basidiósporos viáveis apresentam coloração verde, enquanto que basidiósporos vermelhos são inviáveis (A) Basidiósporos permeabilizados com NaOH a 1000 mmol L⁻¹. (B) Basidiósporos permeabilizados com NaOH a 500 mmol L⁻¹. (C) Basidiósporos permeabilizados com NaOH a 250 mmol L⁻¹. (D) Basidiósporos permeabilizados com NaOH a 100 mmol L⁻¹. (E) Basidiósporos permeabilizados com NaOH a 250 mmol L⁻¹ e Lysing Enzyme (30 mg/mL). (F) Basidiósporos permeabilizados com NaOH a 100 mmol L⁻¹ e Lysing Enzymes (30 mg/mL). (G) Basidiósporos permeabilizados com NaOH a 500 mmol L⁻¹ e Lysing Enzyme (60 mg/mL). (H) Basidiósporos permeabilizados com NaOH a 250 mmol L⁻¹ e Lysing Enzymes (60 mg/mL). (I) Basidiósporos permeabilizados com NaOH a 100 mmol L⁻¹ e Lysing Enzymes (60 mg/mL). (J) Basidiósporos não permeabilizados. Notar que esporos não permeabilizados não emitem fluorescência. (K) Controle morto. Notar que esporos com a membrana plasmática danificada emitem fluorescência vermelha. Barras: 75 µm.48

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Obtenção do material biológico	26
3.2. Permeabilização química	27
3.2.1. Tratamento com Triton X-100	27
3.2.2. Tratamento com ácido metanoico	28
3.2.3. Tratamento com NaOH	29
3.2.4. Permeabilização pela aplicação sequencial de agentes químicos	29
3.3. Permeabilização enzimática.....	30
3.4. Viabilidade dos basidiósporos permeabilizados	30
3.5. Reprodutibilidade do método de permeabilização	31
3.6. Desenho experimental e análises estatísticas	31
4. RESULTADOS	33
5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS.....	54

1. INTRODUÇÃO

Pisolithus Alb. & Schwein. é gênero fúngico de ampla distribuição geográfica, pertencente ao filo Basidiomycota, com corpos de frutificação globosos, hipógeos ou epígeos, com aplicação medicinal e na produção de pigmentos naturais. Sua maior visibilidade deve-se à capacidade de formar associações simbióticas ectomicorrízicas com grupos florestais, alguns de elevada importância econômica, a exemplo dos pinhos e eucaliptos. A espécie *Pisolithus microcarpus* (Cooke & Masee) G. Cunn. é comumente encontrada associada às raízes das árvores em florestas de eucalipto no Brasil.

Entre os benefícios que as associações ectomicorrízicas trazem para as plantas estão a maior resistência a estresses hídrico e salino, maior tolerância a metais pesados no solo, indução da resistência sistêmica às doenças e promoção do crescimento vegetal. Por essa razão, há forte interesse no uso dessas associações na silvicultura, e a obtenção de informações relacionadas à facilitação e melhoramento de tal aplicação é alvo de esforço da comunidade científica há décadas.

A taxa de germinação de basidiósporos de *Pisolithus in vitro* é baixa, fato que inviabiliza o uso desses propágulos como inoculantes ectomicorrízicos comerciais e dificulta a obtenção de isolados monocarióticos, importantes para o desenvolvimento de estudos em genética de fungos. O processo de germinação depende de alguns fatores, incluindo a absorção de compostos indutores do meio, como ácidos orgânicos e flavonoides. Mesmo nas condições mais adequadas conhecidas, apenas entre 0,001 e 0,38 % dos basidiósporos é capaz a produzir hifas *in vitro*.

É insignificante o percentual de basidiósporos que chegam à maturidade sem que possuam núcleo e substâncias de reserva necessárias para a germinação, não sendo a falta de aptidão interna o motivo principal da alta recalcitrância dos esporos. Já foi relatado que durante o processo de maturação dos basidiósporos, há um espessamento progressivo da parede celular, com a deposição de quatro camadas de composição indefinida, que ocasiona a perda da permeabilidade dessa estrutura. A baixa permeabilidade da parede celular dos basidiósporos maduros possivelmente dificulta a difusão de compostos indutores presentes no meio para o interior das células, prejudicando o processo de germinação.

Os basidiósporos maduros de *Pisolithus* são pigmentados, hidrofóbicos, com a parede celular constituída majoritariamente por camadas de quitina e β -1,3-glicanas, além de proteínas dos grupos das manoproteínas e hidrofobinas. A composição desses grupos proteicos possui alta proporção em aminoácidos hidrofóbicos, sendo a presença desses compostos capaz de conferir a característica de hidrofobicidade à parede celular e, juntamente com os pigmentos, promover a baixa permeabilidade dos basidiósporos.

A parede celular de basidiósporos de *P. microcarpus* já foi permeabilizada anteriormente através de tratamento com água sanitária comercial. Por se basear na utilização de produto de limpeza, disponível apenas localmente e com menores exigências em padronização e pureza, a reprodutibilidade desse método torna-se questionável. Além disso, os esporos permeabilizados não apresentaram melhoria na capacidade de germinação, consequência atribuída à perda em viabilidade por danos nas membranas plasmáticas durante o tratamento.

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver método de permeabilização da parede celular de basidiósporos de *P. microcarpus* com agentes químicos e enzimas visando a manutenção da viabilidade desses propágulos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Pisolithus é gênero fúngico com ampla distribuição global, pertencente ao filo Basidiomycota, classe Agaricomycetes, ordem Boletales e família Sclerodermataceae (Lima & Baseia, 2008). São agrupados como fungos gasteróides devido à morfologia dos corpos de frutificação, que são macroscópicos, globosos, epígeos ou hipógeos (Lima & Baseia, 2008). Os corpos de frutificação são chamados de basidiomas, com morfologia interna marcada pela presença característica das subunidades de tecido fértil chamadas de peridíolos, que se apresentam como sáculos ovais a oblongos, com dimensões crescentes da base para o ápice e coloração variando entre preto, amarelo e branco (Chambers & Cairney, 1999; Kasuya *et al.*, 2010; Campos & Costa, 2010a; Campos & Costa, 2010b).

Até a década de 1990, o gênero era considerado monoespecífico, sendo comprimido no complexo *Pisolithus tinctorius* (Watling, 1995; Chambers & Cairney, 1999; Cairney, 2002). Hoje, com o avanço das tecnologias de microscopia e a utilização da genética molecular como ferramenta taxonômica, está dividido em pelo menos 15 espécies, incluindo *Pisolithus microcarpus*, que é comumente encontrada associada às florestas plantadas de eucalipto no Brasil (Chambers & Cairney, 1999; Costa, 2002; Cairney, 2002; Kasuya *et al.*, 2010). Os principais caracteres morfológicos distintivos entre as espécies estão nos basidiósporos, em especial, na ornamentação da parede celular (Watling, 1995; Kasuya *et al.*, 2010)

Os basidiomas têm aplicação medicinal contra queimaduras na pele (Dutta & Acharya, 2014) e tumores (Alves *et al.*, 2015), e são fonte de pigmentos naturais utilizáveis na indústria (Câmara, 2019). No entanto, o maior número de publicações científicas a respeito de espécies do gênero *Pisolithus* deve-se à capacidade das mesmas de formar associações ectomicorrízicas (Chambers & Cairney, 1999; Giachini *et al.*, 2000; Domínguez-Núñez *et al.*, 2019).

As ectomicorrizas são associações mutualistas formadas entre fungos dos filios Basidiomycota, Ascomycota e, mais raramente, Zigomycota, e aproximadamente 2% das espécies vegetais conhecidas, predominantemente arbóreas (Brundrett & Tedersoo, 2018; Domínguez-Núñez *et al.*, 2019). Essas associações são caracterizadas pela colonização dos espaços intercelulares do tecido radicular,

formando estrutura chamada rede de Hartig, bem como o crescimento micelial espesso, envelopando a superfície das raízes, formando a estrutura chamada de manto fúngico (Tedersoo *et al.*, 2010; Domínguez-Núñez *et al.*, 2019).

Através das ectomicorrizas, os fungos beneficiam-se com acesso a carboidratos sintetizados pelas plantas. Em troca, aumentam a capacidade das raízes de obter nutrientes (Orwin *et al.*, 2011; Op De Beeck *et al.*, 2018; Nicolás *et al.*, 2019) e água (Marjanovic & Nehls, 2008; Lehto & Zwiazek, 2011; Kumar & Atri, 2018). Os fungos ectomicorrízicos auxiliam a planta na defesa contra patógenos (Corcobado *et al.*, 2015; Bauman *et al.*, 2018) e induzem maior tolerância a estresse salino (Zwiazek *et al.*, 2019; Galardis *et al.*, 2022) e a metais pesados (Colpaert *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2014). Tais benefícios podem culminar em promoção de crescimento vegetal (Alberton *et al.*, 2014; Neba *et al.*, 2016; Szuba *et al.*, 2020; Taniguchi *et al.*, 2021).

Nas associações ectomicorrízicas, há especificidade entre os simbiosiontes. Uma espécie de fungo ectomicorrízico é capaz de se associar naturalmente com um pequeno grupo de espécies vegetais filogeneticamente próximas (Lofgren *et al.*, 2018 Kennedy *et al.*, 2020). Entre os hospedeiros de *Pisolithus* estão grupos florestais de grande importância econômica global, incluindo acácias (Aggangan, 2010; Houlès *et al.*, 2022), castanheiras (Pereira *et al.*, 2012; Bauman *et al.*, 2018), pinhos (Marx, 1977; Liu *et al.*, 2020) e eucaliptos (Marx, 1977; Alberton *et al.*, 2014; Hill *et al.*, 2022).

O Brasil é o maior exportador e o segundo maior produtor de celulose do mundo, atrás somente dos Estados Unidos (IBÁ, 2020; Pena-Vergara *et al.*, 2022). Devido às condições edafoclimáticas do país, considera-se que o Brasil tem vocação para a silvicultura de alta produtividade. De fato, os esforços científicos em melhoramento genético e o desenvolvimento de técnicas silviculturais adequadas elevaram a produtividade das florestas plantadas brasileiras aos níveis mais altos do mundo (IBÁ, 2020; Pena-Vergara *et al.*, 2022). A indústria nacional associada às florestas plantadas movimentou 97.4 bilhões de reais, representando 1.2 % de todo o produto interno bruto (PIB) em 2019. O país possui 9 milhões de hectares de florestas plantadas, sendo 77 % ocupados por eucalipto e 18 % por pinho. Minas Gerais detém 28 % da área de florestas plantadas do país, possuindo o maior percentual entre os estados, seguido de São Paulo e Mato Grosso do Sul (IBÁ, 2020).

A meta-análise de pesquisas realizadas no Brasil demonstrou que a inoculação de espécies do gênero *Pisolithus* às mudas durante a implantação de florestas foi capaz de promover o crescimento das plantas em até 65 %, para o

eucalipto, e 169 %, para o pinho (Alberton *et al.*, 2014). A aplicação de diferentes isolados fúngicos promove o estabelecimento de ectomicorrizas em eucaliptos de forma variada (Rosado, 1993; Albrecht *et al.*, 1994; Pereira *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2010). Diferentes isolados de *Pisolithus* variam na promoção do crescimento de plântulas de *Eucalyptus grandis*, com aumentos de duas a 45 vezes na produção de matéria seca em comparação ao controle não inoculado (Albrecht *et al.*, 1994). A variação nos resultados obtidos com a inoculação de diferentes isolados foi observada, também, em relação à taxa de colonização radicular e à morfologia das ectomicorrizas (Albrecht *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 2007).

Os benefícios da aplicação silvicultural desse gênero fúngico têm sido amplamente relatados (Rosado, 1993; Albrecht *et al.*, 1994; Pereira *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2010; Alberton *et al.*, 2014). Entretanto, avanços importantes para a melhor compreensão da interação fungo ectomicorrízico-hospedeiro ainda são necessários para a seleção e, ou produção de linhagens fúngicas mais eficientes na promoção do crescimento da planta sob diferentes condições edafoclimáticas ou estresses bióticos e abióticos (Rosado, 1993; Albrecht *et al.*, 1994; Costa *et al.*, 2010).

A taxa de germinação *in vitro* dos basidiósporos de *Pisolithus* é baixa, variando entre 0.001 e 0.38 % (Bulmer *et al.*, 1964; Kope & Fortin, 1990; Costa, 2002; Pereira, 2004). Tal característica torna inviável o uso dos esporos fúngicos como inoculantes ectomicorrízicos (Bulmer *et al.*, 1964; Kope & Fortin, 1990; Costa, 2002; Pereira, 2004) e dificulta a obtenção de isolados monocarióticos, importantes para o desenvolvimento de trabalhos de mutagênese, transformação e genética quantitativa (Rosado, 1993; Costa, 2002).

O ciclo de vida de *P. microcarpus*, incluindo detalhes da formação e maturação dos basidiósporos é conhecido (Kope & Fortin, 1990; Brown & Casselton, 2001; Costa, 2002; Campos & Costa, 2010b). Após a liberação dos basidiósporos e sob condições adequadas, esses propágulos podem germinar e dar origem a hifas septadas monocarióticas, contendo um núcleo haploide por compartimento celular. Essa fase é bastante efêmera no ambiente natural, visto que dois fungos com fatores sexuais compatíveis rapidamente se atraem e ocorre o processo de plasmogamia, união dos citoplasmas, formando hifa dicariótica, com dois núcleos haploides por célula (Kope & Fortin, 1990; Brown & Casselton, 2001; Costa, 2002). A planta hospedeira, por meio de exsudatos radiculares, promove e direciona o crescimento fúngico (Lagrange *et al.*, 2001). O micélio cresce em direção às raízes, formando as

ectomicorrizas e, eventualmente, novos basidiomas (Kope & Fortin, 1990; Costa, 2002).

Dentro dos corpos de frutificação, em células terminais especializadas chamadas de basídios, ocorre a formação de novos basidiósporos (Campos *et al.*, 2008; Campos & Costa, 2010a; Campos & Costa 2010b). O processo inicia-se com a cariogamia, fusão de dois núcleos haploides da célula basidial, formando um único núcleo diploide (Campos & Costa 2010b). Ocorre, então, a meiose, originando quatro núcleos haploides (Campos & Costa 2010b). Ainda no basídio, esses núcleos sofrem uma rodada de mitose pós-meiótica, resultando em oito núcleos haploides (Campos & Costa 2010b). Os núcleos haploides assim formados migram para o interior dos basidiósporos de forma assíncrona (Campos & Costa 2010b).

Durante o desenvolvimento dos basidiósporos, ocorre a transferência e, ou acúmulo de lipídios, ácidos graxos, glicogênio, polissacarídeos, RNA e proteínas no interior das células (Campos *et al.*, 2008; Campos & Costa, 2010a). A presença de compostos de reserva no interior dos basidiósporos, bem como o fato desses propágulos serem nucleados, indicam que as baixas taxas *in vitro* não se devem à falta de potencial interno para a germinação (Campos *et al.*, 2008; Campos & Costa, 2010a; Campos & Costa 2010b).

A análise transcriptômica durante a basidiosporogênese de *P. microcarpus* revelou a expressão de genes relacionados à meiose e à mitose nas fases iniciais de formação dos basidiósporos, e de genes relacionados ao transporte de moléculas e à síntese de ácidos graxos, lipídios e aminoácidos nas fases finais (Pereira *et al.*, 2017). Durante todo o processo de maturação, são expressos genes relacionados à síntese de proteínas estruturais hidrofóbicas da parede celular (Pereira *et al.*, 2017).

À medida que os basidiósporos de *P. microcarpus* amadurecem, o padrão de emissão de fluorescência dos mesmos, quando corados com calcofluor, varia (Campos & Costa, 2010b). Esse fenômeno foi atribuído às mudanças na composição da parede celular ao longo da basidiosporogênese, com o depósito progressivo de componentes estruturais das quatro camadas distintas que constituem essa estrutura, promovendo seu espessamento (Mims, 1980; Campos & Costa, 2010b). Como consequência da deposição das camadas da parede dos basidiósporos e da incorporação de proteínas hidrofóbicas, a parede celular torna-se progressivamente impermeável (Costa, 2002; Campos & Costa, 2010b; Godinho, 2011; Silvério *et al.*, 2021).

A porcentagem de viabilidade de basidiósporos maduros de *P. microcarpus* é desconhecida. O percentual de basidiósporos viáveis dos fungos saprofitos *Marasmius oreades* e *Pleurotus ostreatus*, determinado com o método do sal de tetrazólio, foi de mais de 99 %, mesmo após o armazenamento dos esporos por um mês (Miller *et al.*, 1993). Já para os fungos ectomicorrízicos *Rhizopogon subcaerulescens* e *Suillus brevipes*, utilizando-se o mesmo método, os percentuais de esporos viáveis encontrados foram de 92 e 80 %, respectivamente (Miller *et al.*, 1993). Os autores atribuíram a menor viabilidade dos basidiósporos dos fungos ectomicorrízicos à baixa permeabilidade da parede celular, que influenciou negativamente a eficiência do método de avaliação da viabilidade (Miller *et al.*, 1993).

A germinação de basidiósporos de fungos ectomicorrízicos é influenciada por diversos fatores e nem todos são conhecidos (Fries *et al.*, 1987; Lagrange *et al.*, 2001; Costa, 2002; Deveau *et al.*, 2012). Moléculas exsudadas pelas raízes das plantas, que são encontradas em maior concentração no solo rizosférico, incluindo flavonoides, ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares redutores e hormônios vegetais são capazes de promover a germinação de esporos, o crescimento e direcionamento dos micélios em direção ao hospedeiro e a colonização ectomicorrízica (Fries *et al.*, 1987; Lagrange *et al.*, 2001; Costa 2002; Costa *et al.*, 2003; Pereira, 2004; Deveau *et al.*, 2012).

A adição dos ácidos fumárico, succínico, láctico, cítrico e do flavonoide quercetina ao meio de cultura foram capazes de estimular significativamente a germinação dos basidiósporos de *P. microcarpus*, mas nenhuma das adições foi capaz de elevar a taxa de germinação à valores acima 0,0025 %, ainda considerada baixa (Pereira, 2004). A baixa permeabilidade da parede celular dificulta o transporte das moléculas do meio para o interior dos basidiósporos, impedindo que os mesmos germinem, mesmo na presença de indutores (Costa, 2002; Costa *et al.*, 2003; Pereira, 2004).

Tentativas de obtenção de protoplastos dos fungos ectomicorrízicos *Hebeloma cylindrosporum*, *Hebeloma edurum*, *Hebeloma sinapizans*, *Suillus bellini* e *Pisolithus sp.* foram realizadas pelo tratamento das hifas fúngicas com mistura de enzimas líticas (Hebraud & Fevre, 1987). Os protoplastos são células livres de parede celular, sendo importantes para a realização de fusão de protoplastos e transformação genética mediada por polietilenoglicol (PEG) e eletroporação. Os protoplastos foram obtidos com sucesso para todos os fungos ectomicorrízicos testados, exceto em

Pisolithus sp. (Hebraud & Fevre, 1987). O fracasso na obtenção de protoplastos para esse fungo foi atribuído ao excesso de pigmentos das hifas, que diminuiu a susceptibilidade da parede celular às enzimas líticas (Hebraud & Fevre, 1987).

Pigmentos são moléculas que absorvem radiação luminosa em determinados comprimentos de onda na região visível (~350 a 750 nm), provocando alterações na coloração (Britton, 1983). As melaninas são pigmentos de cor preta ou marrom escuro, de natureza hidrofóbica, frequentemente produzidas por fungos, podendo acumular-se na superfície externa da parede celular após serem secretadas ou participar de sua composição estrutural (Paolo *et al.*, 2006; Gow *et al.*, 2017). Essas moléculas têm função na interação dos fungos com o ambiente, especialmente na resistência a estresses, sendo a quantidade produzida fortemente regulada em resposta às condições ambientais (Dadachova & Casadevall, 2008; Suwannarach *et al.*, 2019). Em fungos ectomicorrízicos, as melaninas têm papel importante na tolerância a metais pesados (Grazziotti *et al.*, 2001) e ao estresse hídrico (Fernandez & Koide, 2013). Em geral, as melaninas, por apresentarem natureza hidrofóbica, podem contribuir para a baixa permeabilidade da parede celular de esporos e hifas (Nosanchuk *et al.*, 2015).

Quando a concentração de melanina na parede celular das células da levedura *Hortaea werneckii*, patogênica aos seres humanos, é aumentada em resposta a modificações nas condições ambientais, há perda significativa da permeabilidade, fenômeno atribuído à obstrução parcial de poros da parede celular por grânulos de melanina (Kogej *et al.*, 2007). Situação semelhante ocorre com o fungo *Cryptococcus neoformans* (Jacobson & Ikeda, 2005). A parede celular da levedura patogênica *Exophiala dermatitidis* é altamente resistente, enquanto a parede celular de linhagens albinas da mesma espécie é facilmente digerida por enzimas líticas (Montijn *et al.*, 1997).

Em *Pisolithus sp.*, na presença do metal tóxico cromo, genes relacionados à síntese de melaninas nos esporos são altamente expressos (Shi *et al.*, 2019). A adição de acetoseringona, metabólito secundário produzido pela planta hospedeira, estimulou a secreção e acúmulo de pigmentos escuros, semelhantes à melanina, no exterior da parede celular de *Pisolithus sp.*, indicando a participação dessa classe de compostos na formação de ectomicorrizas (Herrera-Martínez *et al.*, 2014).

Além das melaninas, outros três pigmentos estão presentes em fungos do gênero *Pisolithus*, a saber, a badiona A, a norbadiona A e a pisoquinona. Todos são classificados como pigmentos derivados do ácido pulvínico e possuem coloração

amarela, laranja e marrom (Velizek & Cejpek, 2011; Câmara, 2019). Acredita-se que essas moléculas desempenhem papel na obtenção de íons de potássio do solo e, posterior, na transferência do nutriente para o hospedeiro via ectomicorrizas (Gill & Kiefel, 1994). Além disso, esses compostos podem ter papel na proteção do fungo e da planta contra patógenos (Gill & Kiefel, 1994).

A parede celular é estrutura essencial para a sobrevivência, a morfogênese e a comunicação dos fungos no ambiente (Gow *et al.*, 2017). A composição da parede afeta a ecologia do fungo e está envolvida em funções vitais, tais como a proteção frente a flutuações osmóticas, sinalização celular (Schoffelmeer *et al.*, 1999; Bowman & Free, 2006), aderência a substratos, interação com o ambiente, reconhecimento de hospedeiros, compatibilidade vegetativa, reprodução e dispersão (Schoffelmeer *et al.*, 1999; Gow *et al.*, 2017).

A composição química da parede celular de hifas e esporos fúngicos é variável, sendo os constituintes principais polissacarídeos, proteínas, pigmentos, lipídeos, polifosfatos e ions inorgânicos (Gooday, 1994; Gow *et al.*, 2017). Essa estrutura é responsável por 15 a 30 % do peso seco da célula fúngica (Klis *et al.*, 1999). Os polissacarídeos correspondem de 60 a 90 % da massa seca das hifas, enquanto as proteínas, até 10 % (Chaud & Sgarbierri, 2006). Em esporos e leveduras, as proteínas podem compor entre 20 e 50 % do peso seco da parede celular (Schneider *et al.*, 1977; Cole *et al.*, 1979; Fleet *et al.*, 1991).

A parede celular de basidiósporos de *Pisolithus* é estruturada em quatro camadas com eletrodensidades distintas, sendo a última camada a mais espessa e com presença de ornamentação em forma de espículas (Mims, 1980; Campos & Costa, 2010b; Silvério, 2021). Os polissacarídeos dos tipos β -1,3-glicana e quitina são predominantes na composição química da parede das hifas (Martin *et al.*, 1999; Santos, 2007). Os grupos de proteínas ancoradas à estrutura correspondem às manoproteínas e às hidrofobinas (Tagu *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 1999; Tagu *et al.*, 2000; Duplessis *et al.*, 2001).

As proteínas da parede celular de fungos podem ser classificadas de acordo com a forma com que estão associadas à parede e quanto à susceptibilidade a certos métodos de extração (Pitarch *et al.*, 2008). Assim, as proteínas de parede podem ser classificadas em quatro grupos (Pitarch *et al.*, 2008). As que estão ancoradas por meio de ligações fracas, não-covalentes ou pontes dissulfeto, a outras proteínas da parede celular compõem o grupo das extraíveis por surfactantes. Quando são ancoradas

diretamente às β -1,3-glicanas por ligações álcali-sensíveis, compõem o grupo das extraíveis por soluções de hidróxido de sódio. As que estão ligadas à β -1,3-glicanas diretamente por outros tipos de ligação ou indiretamente por meio de β -1,6-glicanas, correspondem ao grupo das extraíveis por β -1,3-glicanase. Por último, há o grupo das extraíveis por exoquitinases, reunindo as proteínas ancoradas direta ou indiretamente à quitina (Pitarch *et al.*, 2008).

Manoproteínas são glicoproteínas constituídas principalmente por polissacarídeos de manose com cadeias curtas, covalentemente ligados a cadeias laterais de polipeptídios (Funakoshi & Suzuki, 2009). Outros açúcares também são encontrados, mas em quantidades menores (Quirós *et al.*, 2010). Entre eles destacam-se: a glicose, a galactose e a xilose (Quirós *et al.*, 2010). Nas manoproteínas, há a predominância dos aminoácidos hidrofóbicos valina, alanina, isoleucina e leucina, conferindo hidrofobicidade à parede celular (Silva Araújo *et al.*, 2014). As manoproteínas correspondem ao grupo proteico mais abundante na parede celular de hifas de *Pisolithus* e podem estar envolvidas com importantes funções, a exemplo da adesão, permeabilidade, reprodução e modulação do reconhecimento imunológico (Tagu & Martin, 1996; Martin *et al.*, 1999; Gow *et al.*, 2017). As manoproteínas distribuem-se nas distintas camadas da parede celular de alguns fungos por meio de diferentes tipos de ligação (Pitarch *et al.*, 2008).

Hidrofobinas são proteínas pequenas e hidrofóbicas encontradas exclusivamente em fungos filamentosos (Wessels, 1996; Macindoe *et al.*, 2012). A composição em aminoácidos desse grupo de proteínas é variada, exceto por oito resíduos de cisteína conservados que formam quatro pontes dissulfeto (Wessels, 1996; Macindoe *et al.*, 2012). São localizadas principalmente na região mais externa da parede celular e têm função no crescimento de micélio aéreo, agregação das hifas e adesão à superfície do hospedeiro (Wessels, 1996; Linder, 2005). São divididas em duas classes, I e II, baseado em diferenças estruturais, tais como o espaçamento entre os resíduos de cisteína, e nas propriedades físicoquímicas dos agregados que formam na superfície das células (Wessels, 1996; Linder, 2005).

Hidrofobinas de classe I arranjam-se em finas camadas estáveis chamadas de *rodlets*, que cobrem a superfície do fungo e são dificilmente desestruturadas (Kwan *et al.*, 2006; Morris *et al.*, 2013). A extração de hidrofobinas da classe I foi obtida por meio do uso dos ácidos trifluoracético e metanoico (Wessels *et al.*, 1991; de Vries *et al.*, 1993). As da classe II não formam *rodlets* e, sim, monocamadas de proteínas

ligadas entre si por ligações fracas, podendo ser extraídas com uso de surfactantes (Wessels *et al.*, 1991; Ren *et al.*, 2013).

Em *Pisolithus*, foram encontrados três cDNA correspondentes a hidrofobinas hydPt-1, hydPt-2 e hydPt-3, todas da classe I (Tagu *et al.*, 1996; Tagu *et al.*, 2000; Duplessis *et al.*, 2001). Durante o processo inicial de colonização do hospedeiro para a formação de ectomicorrizas, os três genes são altamente expressos, indicando que as hidrofobinas têm participação nessa fase. Acredita-se que possam ter função na adesão do fungo à superfície da raiz ou na agregação das hifas para penetração no tecido radicular (Tagu *et al.*, 1996; Tagu *et al.*, 2000; Duplessis *et al.*, 2001).

Tratamentos baseados na utilização de ácidos fortes, enzimas líticas e diferentes marcas de água sanitária comercial já foram testados na intenção de permeabilizar basidiósporos de *P. microcarpus* (Costa, 2002; Godinho, 2011; Silvério *et al.*, 2021). A água sanitária produzida por algumas marcas mostrou-se eficiente no processo, obtendo-se valores superiores a 80 % de permeabilização nos melhores tratamentos (Godinho, 2011; Silvério *et al.*, 2021). A variação nos resultados com a aplicação de diferentes marcas de água sanitária demonstrou que a utilização de desse produto comercial compromete a reprodutibilidade do método (Silvério *et al.*, 2021), sendo que a permeabilização pode ter sido causada por outros componentes do produto, uma vez que a utilização de hipoclorito de sódio puro não ocasionou a permeabilização obtida com a água sanitária (Dados não publicados). Um dos componentes importantes utilizados para a estabilização da água sanitária comercial é o hidróxido de sódio.

Os esporos permeabilizados pelo método de Silvério *et al.* (2021) apresentaram a morfologia da camada mais externa da parede celular alterada, não sendo possível detectar danos às demais camadas por meio das imagens de microscopia eletrônica. A viabilidade das células, no entanto, foi comprometida e nenhum aumento na taxa de germinação dos basidiósporos tratados em relação ao controle foi observado.

A remoção sequencial de componentes da parede celular dos basidiósporos de *P. microcarpus*, a exemplo de pigmentos, hidrofobinas e manoproteínas, pode ser realizada por meio do uso de reagentes específicos, tais como surfactantes, ácidos orgânicos e bases (Pitarch *et al.*, 2008; Wessels *et al.*, 1996). Idealmente, a permeabilização efetuada por agentes químicos (Costa 2002; Godinho, 2012; Silvério *et al.*, 2021) ou enzimáticos deve conservar a viabilidade dos basidiósporos.

A germinação de basidiósporos de *P. microcarpus* não permeabilizados é demorada, levando de 20 a 70 dias para o aparecimento de colônias no meio, na presença de plântulas hospedeiras (Costa 2002; Costa *et al.*, 2003; Pereira, 2004). A permeabilização da parede celular, por facilitar a entrada de compostos estimulantes da germinação nas células, pode reduzir o tempo necessário para surgimento das colônias, eliminar a necessidade da presença da planta hospedeira e melhorar as porcentagens de germinação, facilitando a produção de estirpes monocarióticas e o desenvolvimento de inoculantes comerciais à base de esporos.

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver método de permeabilização da parede celular de basidiósporos de *P. microcarpus* com agentes químicos e enzimas visando a manutenção da viabilidade desses propágulos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM) do Departamento de Microbiologia, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) – Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais.

3.1. Obtenção do material biológico

Basidiomas maduros e não danificados de *P. microcarpus* foram coletados sob florestas de eucaliptos localizadas no Setor de Silvicultura da UFV e áreas adjacentes ao município de Viçosa, no período de julho a setembro de 2021. As coordenadas geográficas dos pontos de coleta foram registradas através de equipamento de GPS Garmin Etrex® 10. As distâncias foram calculadas através do software de sistema de informação geográfica (SIG) QGIS. O material encontrado dentro de um raio de 100 metros foi agrupado como proveniente de uma mesma área de coleta. No total foram coletados 21 corpos de frutificação, agrupados em nove áreas de coleta distintas.

A superfície externa dos basidiomas foi lavada com água destilada e solução de etanol (70 % v/v) para a remoção de resíduos de substrato e esporos contaminantes. Após secagem ao ar, os corpos de frutificação foram seccionados com o auxílio de um bisturi. Esporos maduros, livres, localizados na região apical dos basidiomas, foram removidos com auxílio de espátula e tamisados em peneira com poros de 2 mm. Os basidiósporos provenientes de uma mesma área de coleta foram misturados e mantidos em geladeira à temperatura de, aproximadamente, 7 °C.

Em todas as análises, exceto nas que objetivaram avaliar a reprodutibilidade do método, foram utilizadas amostras compostas, constituídas de basidiósporos provenientes de todas as áreas de coleta. Para tal, porções de 5 g de basidiósporos de cada área de coleta foram adicionadas em um mesmo recipiente e homogeneizadas.

3.1.1. Pré-tratamento dos basidiósporos

Imediatamente antes de serem utilizados nos experimentos de permeabilização, os basidiósporos foram submetidos a pré-tratamento padrão com surfactante, adaptado de Costa (2002), objetivando torná-los imersíveis em água. Dessa forma, porções de 50 mg de basidiósporos foram separadas em microtubos de 2 mL, onde foram adicionados 1 mL de solução do surfactante Triton X-100 a 0,5 % (v/v) em tampão fosfato salino (PBS). A suspensão foi mantida sob agitação suave por 5 min e depois centrifugada a 14000g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com PBS.

3.2. Permeabilização química

3.2.1. Tratamento com Triton X-100

Com o objetivo de remover pigmentos e proteínas estruturais ancoradas a parede celular por ligações fracas, foram testados tratamentos à base de surfactante segundo Pitarch *et al.* (2008), com adaptações. Os basidiósporos, preparados como descrito acima (Item 3.1.1), foram suspensos em soluções de Triton X-100 a diferentes concentrações (0, 0,5, 1, 2 e 3 % v/v) em PBS. As suspensões foram agitadas em vórtex e mantida em banho-maria a 35 °C por diferentes tempos (1, 5, 15, 30, 60 e 120 min). A cada 15 min, as suspensões foram agitadas em vórtex e, após o tempo de incubação, centrifugadas a 14000g por 5 min. Os sobrenadantes foram reservados para análise do teor de pigmentos e concentração de proteínas, e os basidiósporos foram lavados três vezes com PBS para quantificação do percentual permeabilizado.

Para determinação da liberação de pigmentos da parede celular, os sobrenadantes foram diluídos em água destilada (1:10) e filtrados com membrana de nitrocelulose com poros de 0,22 µm. Os brancos consistiram das soluções do agente permeabilizador diluídas em água destilada (1:10). O espectro de absorção na faixa visível, entre 350 e 700 nm, e a absorbância dos sobrenadantes nos comprimentos de onda de máxima absorção, foram obtidos em espectrofotômetro Genesys™.

A quantificação de proteínas extraídas foi realizada pelo método do ácido bicinconínico (Smith *et al.*, 1985) com o sobrenadante diluído e filtrado como descrito acima. Para tal, 1 mL do sobrenadante diluído e filtrado foi adicionado a tubos de ensaio e acrescidos de 1 mL do reagente de determinação, composto por solução de sulfato de cobre (II) pentahidratado a 4 % p/v e ácido bicinconínico na proporção de

1:50 v/v. Os tubos foram agitados em vórtex e incubados em banho-maria a 37 °C por 30 min, seguido de repouso por 20 min a temperatura ambiente. A absorbância do sobrenadante foi determinada a 562 nm em espectrofotômetro Genesys™. A concentração de proteínas foi determinada com base em curvas padrão construídas com BSA nas concentrações de 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6 1,8 e 2,0 mg mL⁻¹, nas soluções do agente permeabilizador diluídas em água destilada (1:10). Cada repetição dos tratamentos de permeabilização e as curvas de BSA foram preparadas e analisadas em triplicata.

O percentual de basidiósporos permeabilizados foi calculado por meio do método de coloração por Sudan Black B, adaptado de Costa (2002). Os esporos presentes nos *pellets* após o tratamento de permeabilização foram ressuspensos em 500 µL de solução do corante Sudan Black B a 3 % (p/v) em etanol a 70 % (v/v). A suspensão foi agitada em vórtex e mantida ao abrigo de luz durante 30 minutos, sendo posteriormente agitada da mesma forma e centrifugada a 14000g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e os esporos lavados uma vez com etanol a 70 % (v/v) e duas vezes água destilada. Os basidiósporos foram ressuspensos em 1 mL de água destilada e uma alíquota de 16 µL da suspensão foi montada entre lâmina e lamínula e observada ao microscópio óptico com a objetiva de 40X. Foram considerados permeabilizados os esporos que se coraram de preto, indicando a penetração do corante e a reação do mesmo com os ácidos graxos de reserva (Campos *et al.*, 2008; Silvério *et al.*, 2021). A porcentagem de esporos corados foi determinada pela observação de 5 campos aleatórios de três lâmina montadas para cada repetição do tratamento.

3.2.2. Tratamento com ácido metanoico

Com o objetivo de remover proteínas do grupo das hidrofobinas de classe I, foi testado o método proposto por Wessels *et al.* (1991), com modificações. Basidiósporos pré-tratados (item 3.1.1) foram lavados duas vezes em solução de NaCl a 0,6 mol L⁻¹ e ressuspensos em concentrações crescentes de ácido metanoico (0, 1, 5, 10 e 75 %) na proporção de 1:1 v/v onde permaneceram por diferentes tempos (1, 5, 15, 30, 60 e 120 min). A cada 15 min, as suspensões mantidas à temperatura ambiente, foram agitadas em vórtex e, após o tempo de incubação, centrifugadas a 14000g por 5 min. Os sobrenadantes foram reservados para análise do teor de

pigmentos e concentração de proteínas, e os basidiósporos foram lavados três vezes com PBS para a determinação da porcentagem de basidiósporos permeabilizados, conforme descrito acima (item 3.2.1).

3.2.3. Tratamento com NaOH

A remoção de pigmentos e proteínas estruturais ancoradas à parede celular por ligações alcali-sensíveis foi realizado segundo o método de Pitarch *et al.* (2008), com modificações. Basidiósporos pré-tratados (item 3.1.1) foram lavados duas vezes em solução de NaCl a $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ e ressuspensos em soluções de NaOH a diferentes concentrações (0, 50, 100, 250, 500 e 1000 mmol L^{-1}) em NaCl ($0,6 \text{ mol L}^{-1}$), sendo mantidas à temperatura ambiente por diferentes tempos (1, 5, 15, 30 e 60 e 120 min). A cada 15 min, as suspensões mantidas à temperatura ambiente, foram agitadas em vórtex e, após o tempo de incubação, centrifugadas a $14000g$ por 5 min. Os sobrenadantes foram reservados para análise do teor de pigmentos e concentração de proteínas, e os basidiósporos foram lavados três vezes com PBS para a determinação da porcentagem de basidiósporos permeabilizados, conforme descrito acima (item 3.2.1).

3.2.4. Permeabilização pela aplicação sequencial de agentes químicos

Com base nos resultados obtidos na extração de pigmentos e proteínas dos basidiósporos com os agentes químicos testados individualmente (Triton X-100, ácido metanoico e NaOH), foi realizada a permeabilização pela aplicação sequencial dos agentes químicos avaliados neste trabalho. Para tal, foram selecionados os tratamentos com as menores concentrações do agente de permeabilização e tempos que levaram às maiores remoções de pigmentos e proteínas (Triton X-100 a 1 % v/v, por 60 min; ácido metanoico a 5 % v/v, por 1 min). Para o NaOH, selecionou-se a concentração de 500 mmol L^{-1} por 1 min. Esses agentes foram usados para tratar os basidiósporos sequencialmente e em três ordens diferentes: 1) Triton 100-X → ácido metanoico → NaOH; 2) NaOH → Triton 100-X → ácido metanoico; 3) Triton 100-X → NaOH → ácido metanoico. A porcentagem de basidiósporos permeabilizados foi determinada como descrito no item 3.2.1.

3.3. Permeabilização enzimática

3.3.1 Tratamento com enzimas líticas

Basidiósporos pré-tratados foram submetidos à permeabilização com diferentes concentrações de NaOH (0, 50, 100, 250 e 500 mmol L⁻¹) por um min, sendo posteriormente lavados por três vezes com manitol a 0,8 mol L⁻¹ e ressuspensos em 1 mL das soluções contendo os coquetéis de enzimas líticas Lysing Enzymes (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e Driselase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e a mistura de Lysing Enzymes + Driselase, preparadas no mesmo estabilizador osmótico. A concentração das enzimas testadas foi de 15 mg mL⁻¹. Adicionalmente, para Lysing Enzymes, as concentrações de 30 e 60 mg mL⁻¹ foram também testadas. As suspensões de basidiósporos em manitol a 0,8 mol L⁻¹ contendo as enzimas líticas foram submetidas a agitação de 80 rpm, a 30 °C, por cinco horas. Após o período de incubação, as suspensões foram centrifugadas 14000g por 10 min, lavadas e ressuspensas em manitol a 0,8 mol L⁻¹. Foram avaliadas as alterações morfológicas dos basidiósporos por meio de preparações a fresco, entre lâmina e lamínula. A porcentagem de permeabilização foi determinada como descrito no item 3.2.1.

Lysing Enzymes e Driselase são misturas de enzimas líticas comerciais utilizadas para a hidrólise da parede celular de células fúngicas. Lysing Enzymes é constituída de β -glicanase, celulase, quitinase e protease, produzidas por *Trichoderma harzianum*. A Driselase contém laminarinase, xilanase e celulase produzidas por fungo basidiomiceto não especificado.

3.4. Viabilidade dos basidiósporos permeabilizados

Os basidiósporos permeabilizados foram avaliados quanto à viabilidade com o kit LIVE/DEAD™ FungaLight™ Yeast Viability (Thermo Fisher Scientific, Cleveland, OH, EUA), seguindo-se as instruções do fabricante. O procedimento consiste na aplicação simultânea dos corantes fluorescentes iodeto de propídio e SYTO® 9. Células viáveis são coradas apenas por SYTO® 9 exibindo fluorescência verde, enquanto que as células com a membrana celular danificada absorvem os dois corantes, emitindo fluorescência vermelha ou alaranjada, quando excitadas no comprimento de onda correto. Para a determinação da viabilidade, os basidiósporos

foram submetidos à permeabilização com NaOH a 0, 50, 100, 250, 500 e 1000 mmol L⁻¹ conforme descrito no item 3.2.3, seguido da coloração com o kit LIVE/DEAD™ Funga Light™ Yeast Viability. Adicionalmente testaram-se as seguintes combinações de permeabilização: 1) NaOH a 100 e 250 mmol L⁻¹ e Lysing Enzymes a 30 mg mL⁻¹ e 2) NaOH a 100, 250 e 500 mmol L⁻¹ e Lysing Enzymes a 60 mg mL⁻¹. Os procedimentos de permeabilização com NaOH e Lysing Enzymes foram feitos como descrito no item 3.4. Após a permeabilização, os basidiósporos foram corados com o kit LIVE/DEAD™ FungaLight™ Yeast Viability. Um tratamento controle com basidiósporos mortos foi realizado por meio da suspensão de esporos permeabilizados com NaOH 1000 mmol L⁻¹ em 1 mL de etanol 70 % (v/v) durante cinco horas, com agitação em vórtex a cada 30 minutos. Após o período, a suspensão de basidiósporos foi centrifugada e o *pellet* foi lavado e ressuspendido em NaCl a 0,6 mol L⁻¹, seguido da coloração com o kit LIVE/DEAD™ FungaLight™ Yeast Viability. Para cada tratamento de permeabilização e o controle, foram montadas três preparações microscópicas por repetição. Para tal, 16 µL da suspensão de esporos permeabilizados e do controle foram montadas entre lâmina e lamínula e observadas ao microscópio EVOS™ M5000, equipado com os cubos de luz GFP 2.0 e RFP 2.0. Cinco imagens em campos aleatórios das lâminas foram capturadas pelo sistema e utilizadas para o cálculo do percentual de basidiósporos viáveis.

3.5. Reprodutibilidade do método de permeabilização

Amostras de 50 mg de basidiósporos oriundos de 9 áreas foram submetidas à permeabilização com NaOH a 500 mmol L⁻¹ por 1 min (item 3.2.3). Os basidiósporos foram lavados três vezes com PBS para a determinação da porcentagem de basidiósporos permeabilizados, conforme descrito acima (item 3.2.1) e as médias obtidas foram comparadas.

3.6. Desenho experimental e análises estatísticas

Todos os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com esquema fatorial e três repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Calcularam-se os coeficientes de correlação de Pearson

entre o percentual de permeabilização promovido pelos tratamentos com NaOH e os valores de pigmentos e proteínas obtidos nos sobrenadantes. As análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8 e o pacote ExpDes.pt (Ferreira *et al.*, 2013) para o software R.

4. RESULTADOS

4.1. Permeabilização química

4.1.1 Tratamento com Triton X-100

O tratamento com Triton X-100, nas concentrações de 0,5, 1, 1,5 e 3 %, levou à remoção de pigmentos dos basidiósporos (Figuras 1 e 2). A interação entre os fatores concentração de Triton X-100 e o tempo foi significativa para a absorbância nos dois comprimentos de onda. Ajustaram-se equações de regressão para cada concentração de surfactante testada (Figuras 1 e 2).

Para os pigmentos analisados no comprimento de onda 350 nm, o tratamento com 0 % de Triton X-100 apresentou extração linear e em menor quantidade (Figura 1). As curvas das demais concentrações apresentaram modelos quadráticos semelhantes entre si (Figura 1). Para os pigmentos analisados no comprimento de 475 nm, não houve efeito do tempo na extração com solução a 0 % de Triton X-100 (Figura 2). Todas as demais concentrações testadas apresentaram modelo significativo, sendo os modelos quadráticos ajustados para as concentrações 1, 1,5 e 3 % muito semelhantes (Figura 2).

O tratamento com Triton X-100 a 1 % e tempo de 60 min foi selecionado para a continuidade dos experimentos, pois foi o de menor concentração e tempo que apresentou máximo valor de absorbância nos dois comprimentos de onda. A média de absorbância obtida foi de 0,352 no comprimento de onda de 350 nm e de 0,420 no comprimento de onda de 475 nm.

Nenhum tratamento à base de Triton X-100 levou à remoção de proteínas (Figura 3) ou à diferença significativa na permeabilização dos basidiósporos em relação ao controle (Figura 4).

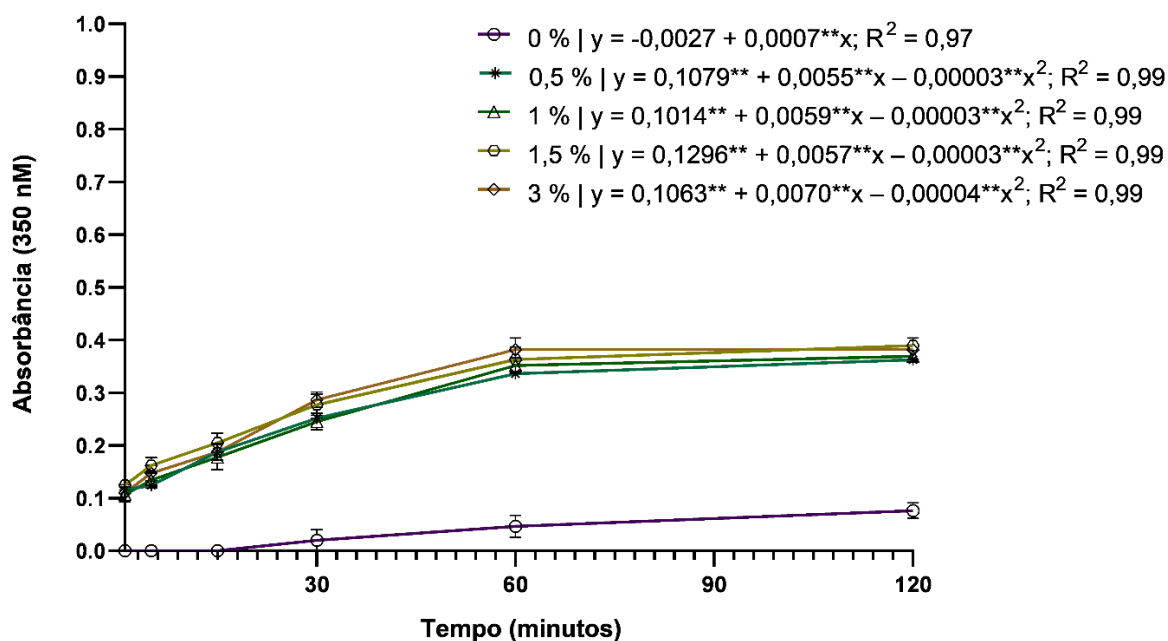


Figura 1. Teores de pigmento no sobrenadante após o tratamento de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* com Triton X-100 a diferentes concentrações e tempos de incubação a 35 °C. A concentração de pigmentos está expressa em valores de absorbância medidos a 350 nm. Ao lado de cada concentração de Triton X-100 testada consta a equação de regressão ajustada, considerando apenas os modelos significativos.

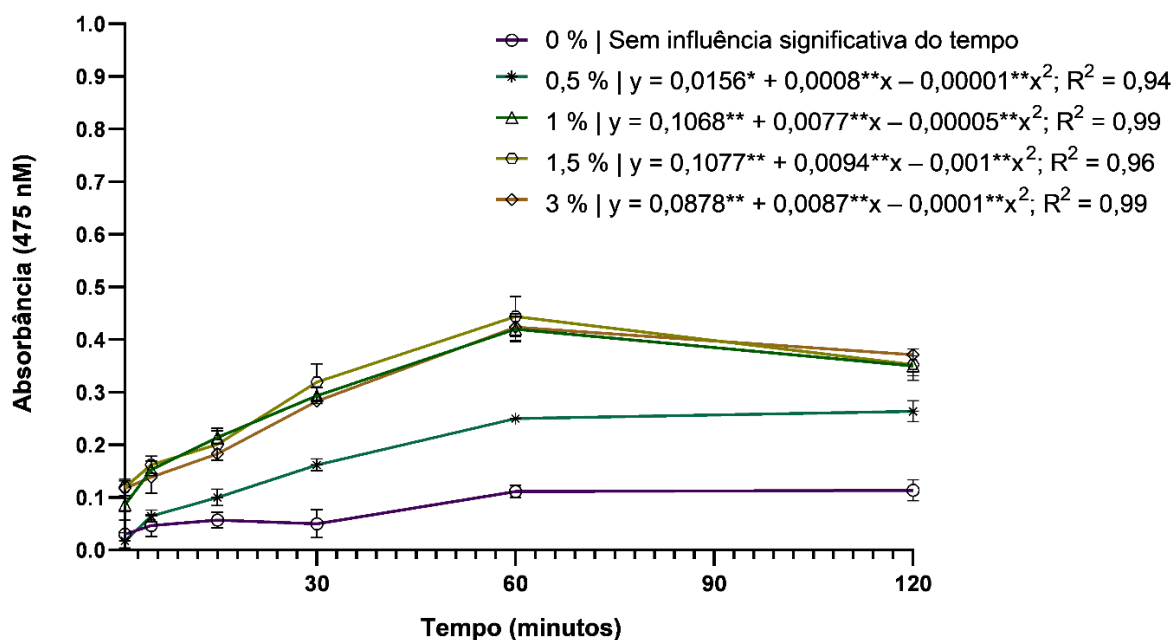


Figura 2. Teores de pigmento no sobrenadante após o tratamento de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* com Triton X-100 a diferentes concentrações e tempos de incubação a 35 °C. A concentração de pigmentos está expressa em valores de absorbância medidos a 475 nm. Ao lado de cada concentração de Triton X-100 testada consta a equação de regressão ajustada, considerando apenas os modelos significativos.

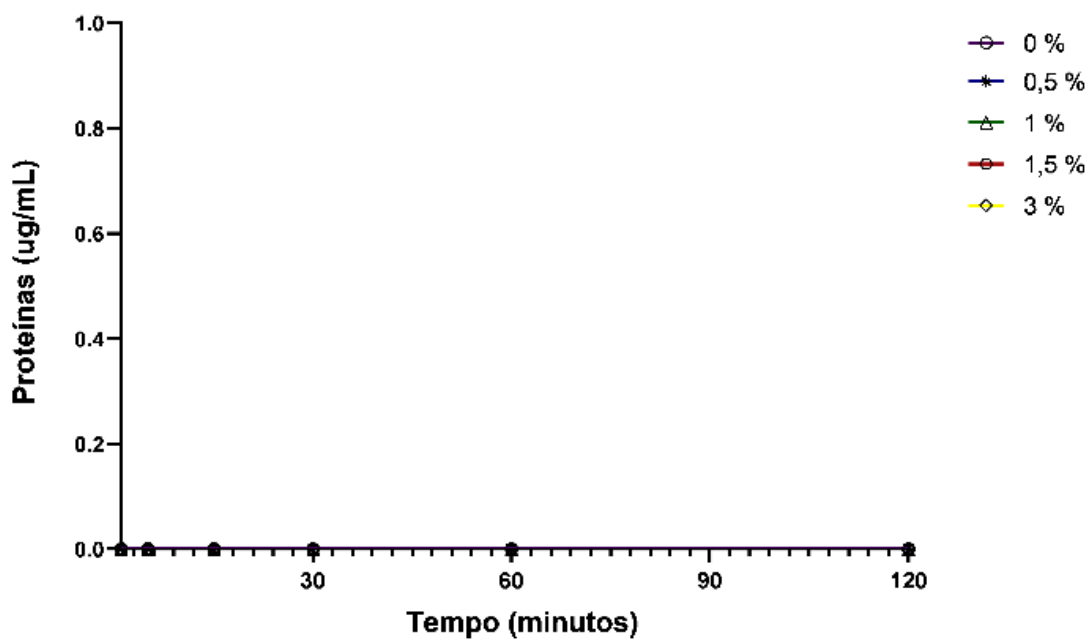


Figura 3. Concentração de proteína no sobrenadante após o tratamento de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* com Triton X-100 a diferentes concentrações e tempos de incubação a 35 °C.

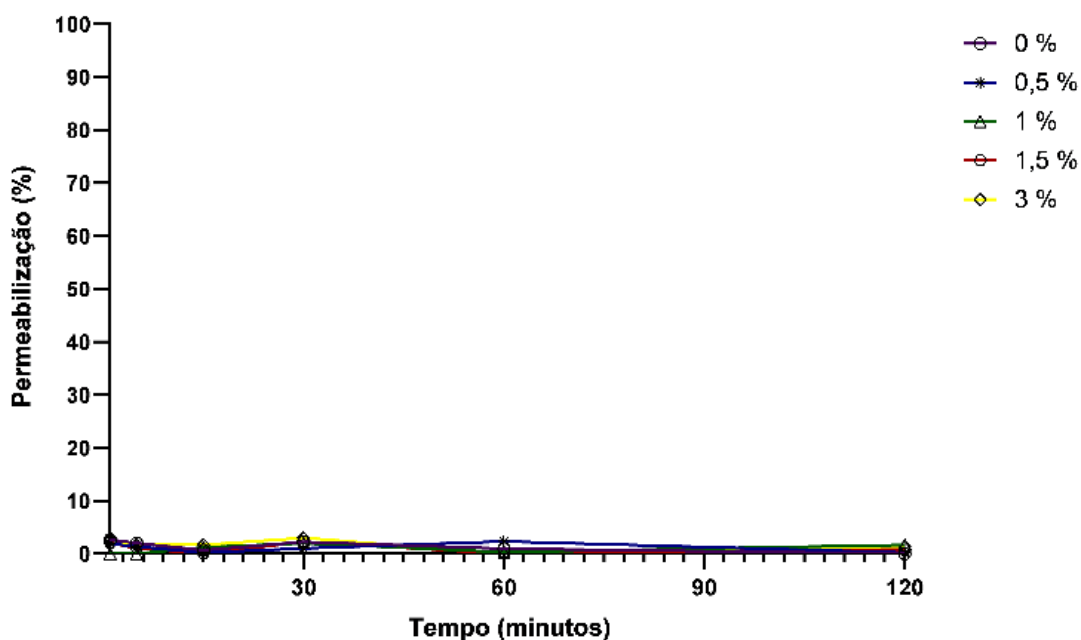


Figura 4. Percentual de permeabilização de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* tratados com Triton X-100 a diferentes concentrações e tempos de incubação a 35 °C.

4.1.2 Tratamento com ácido metanoico

Não houve remoção de pigmentos dos basidiósporos pelo tratamento com ácido metanoico nas concentrações de 0, 1, 5, 10 e 75 % e tempos testados, nos comprimentos de onda de 350 e 475 nm.

Os tratamentos com ácido metanoico em concentrações superiores a 1 %, foram capazes de remover proteínas dos basidiósporos (Figuras 5 e 6). Não houve efeito do tempo de tratamento ou da interação entre o tempo e concentração de ácido metanoico sobre a extração de proteínas por esse composto (Figura 5), sendo observado efeito significativo apenas das diferentes concentrações testadas (Figuras 5 e 6). Foi ajustado um modelo quadrático descrevendo o efeito das concentrações de ácido metanoico na concentração de proteínas presente no sobrenadante (Figura 6).

O tratamento com 5 % de ácido metanoico por 1 min, com média de proteína no sobrenadante de $0,21 \text{ mg mL}^{-1}$ foi o escolhido para a continuidade dos experimentos por ter sido o com menor concentração de ácido metanoico e tempo testado que obteve elevada concentração de proteínas no sobrenadante em relação aos demais.

Os tratamentos com ácido metanoico não foram capazes de promover a permeabilização dos basidiósporos (Figura 7).

4.1.3 Tratamento com NaOH

Os tratamentos com NaOH foram capazes de remover pigmentos dos basidiósporos. (Figura 8). Os sobrenadantes obtidos apresentaram máxima absorbância a 350 nm, não apresentando pico na região de 475 nm. A interação entre a concentração de NaOH empregada e o tempo, bem como o efeito isolado do tempo, foram significativos, e foram ajustadas as equações de regressão para cada uma das concentrações de NaOH testadas. O aumento da concentração de NaOH levou ao aumento da liberação de pigmentos para o sobrenadante (Figura 8).

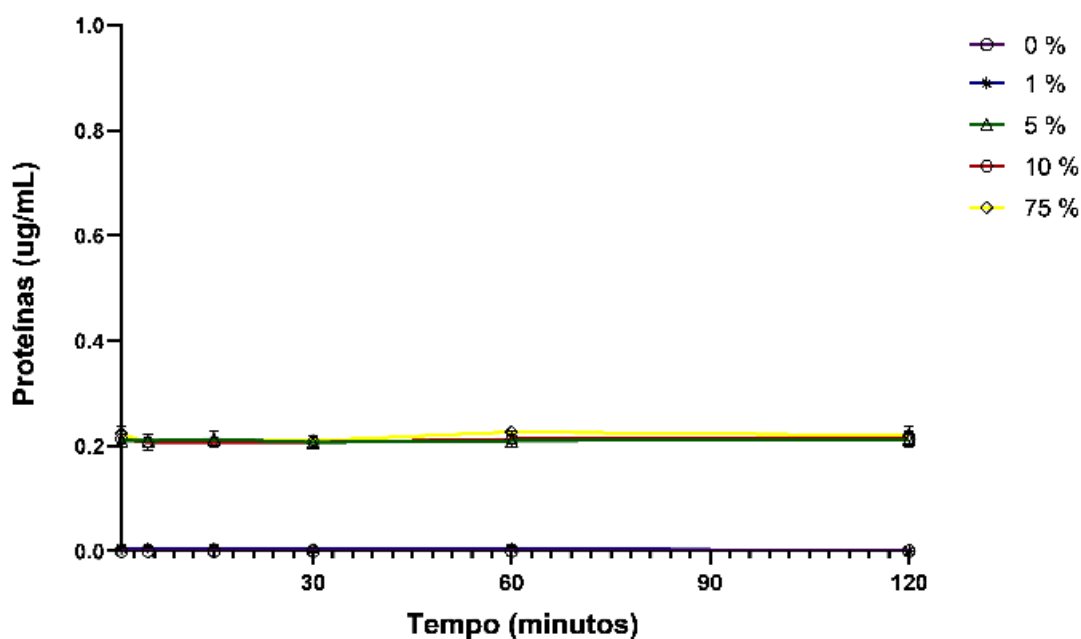


Figura 5. Concentração de proteína no sobrenadante após o tratamento de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* com ácido metanoico a diferentes concentrações e tempos de incubação à temperatura ambiente.

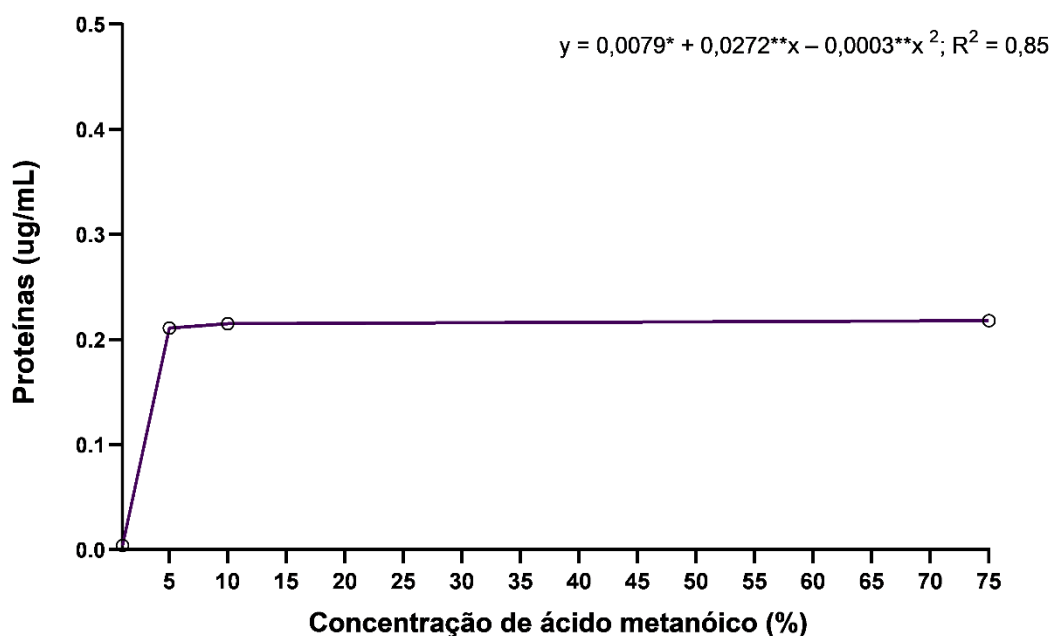


Figura 6. Concentração de proteína no sobrenadante após tratamentos de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* em função da concentração de ácido metanoico. Equação de regressão representativa de modelo quadrático significativo ajustado aos dados.

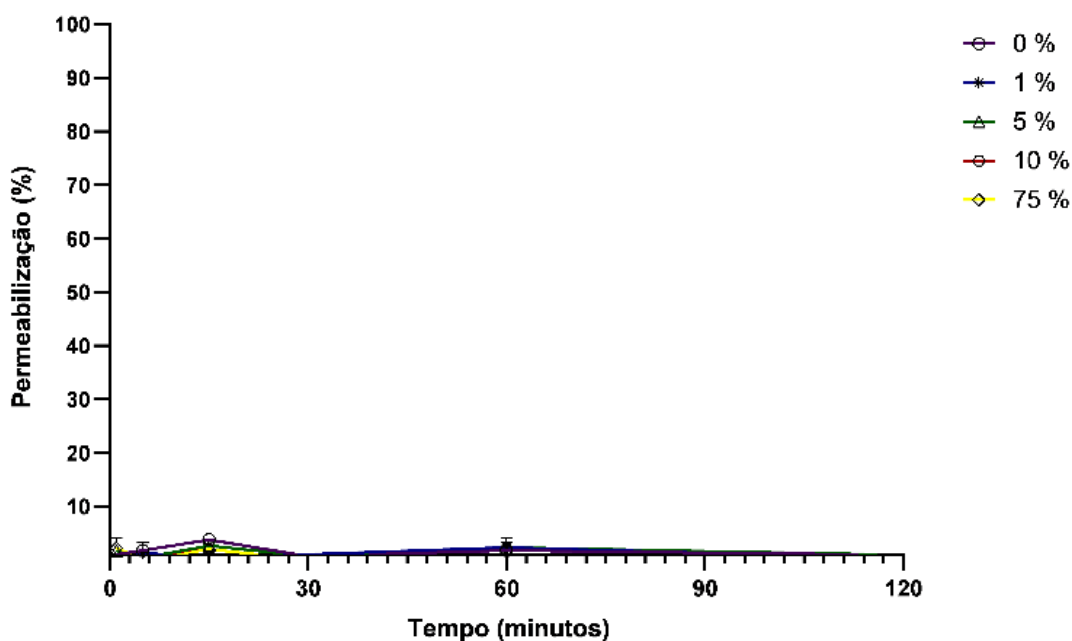


Figura 7. Percentual de permeabilização de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* tratados com metanoico a diferentes concentrações e tempos de incubação à temperatura ambiente.

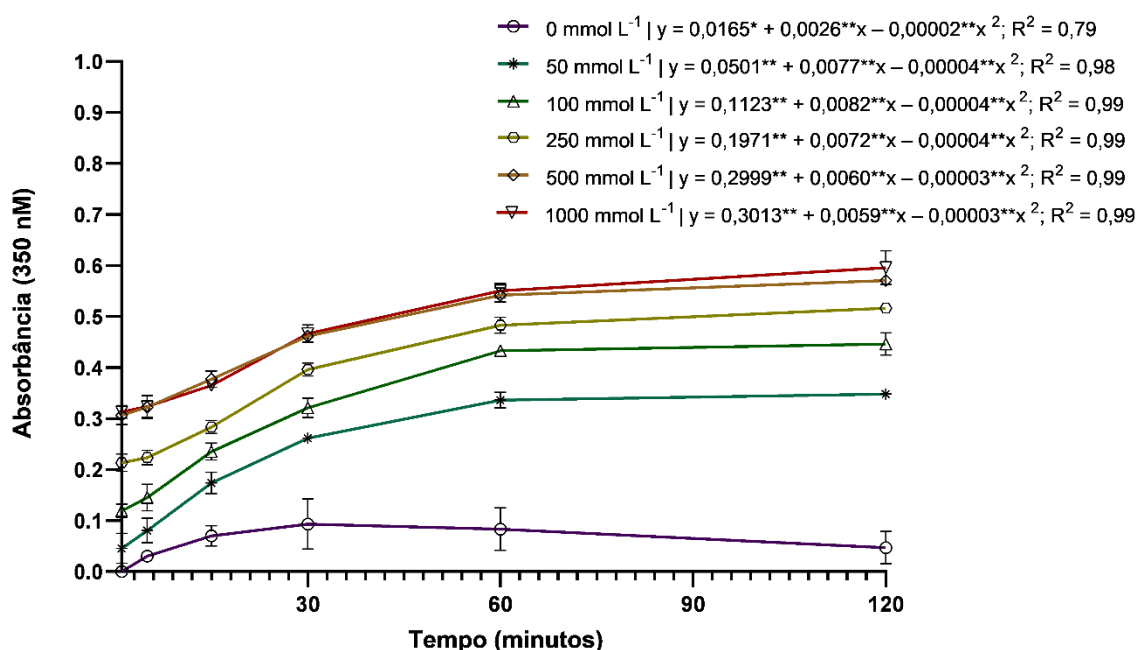


Figura 8. Teores de pigmento no sobrenadante após o tratamento de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* com NaOH a diferentes concentrações e tempos de incubação a temperatura ambiente. A concentração de pigmentos está expressa em valores de absorbância medidos a 350 nm. Ao lado de cada concentração de NaOH testada consta a equação de regressão ajustada, considerando apenas os modelos significativos.

Os modelos ajustados para as concentrações de 500 e 1000 mmol L⁻¹ foram muito semelhantes e atingiram maiores valores nos tempos de 60 e 120 min (Figura 8). Sendo assim, considerou-se o com menor concentração e tempo de exposição, 500 mmol L⁻¹ por 60 min, o mais eficiente na remoção de pigmentos, com absorvância média do sobrenadante em 350 nm de 0,542.

Os tratamentos com NaOH foram capazes de remover proteínas dos basidiósporos (Figuras 9 e 10). As concentrações de proteínas no sobrenadante aumentaram significativamente com as maiores concentrações de NaOH (Figuras 9 e 10). No entanto, o tempo de tratamento e a interação entre o tempo e concentração não se mostraram significativos para essa extração (Figura 9). Foi ajustado um modelo quadrático descrevendo o efeito das concentrações de NaOH na liberação das proteínas (Figura 10). O tratamento à base de NaOH mais eficiente foi o com concentração de 1000 mmol L⁻¹ por 1 min, com média de concentração de proteína no sobrenadante de 0,48 mg/mL.

Tratamentos com NaOH também promoveram a permeabilização da parede celular dos basidiósporos de *P. microcarpus* (Figura 11). De forma semelhante ao observado na remoção de proteínas, não houve influência significativa do tempo e da interação entre tempo e concentração para o percentual de permeabilização (Figura 12), sendo esse aumentado apenas com a elevação da concentração de NaOH empregada (Figuras 12 e 13). Foi ajustado um modelo quadrático descrevendo o efeito das concentrações de NaOH na liberação das proteínas para o sobrenadante (Figura 13). Os tratamentos com 100, 250, 500 e 1000 mmol L⁻¹ de NaOH obtiveram percentual permeabilização superiores aos do controle. O melhor resultado foi obtido com o tratamento com 1000 mmol L⁻¹ por 1 min, com a média de 97 % das dos basidiósporos permeabilizados.

As concentrações de pigmentos e proteínas determinadas nos sobrenadantes dos tratamentos com NaOH correlacionaram-se positiva e significativamente com as porcentagens de basidiósporos permeabilizados (0,6841 e 0,9485, respectivamente).

4.1.4. Permeabilização pela aplicação sequencial de agentes químicos

A aplicação sequencial dos agentes químicos, em qualquer uma das ordens testadas, não levou a valores de permeabilização significativamente diferentes daqueles obtidos com o uso exclusivo de NaOH a 500 mmol L⁻¹ (Figura 14).

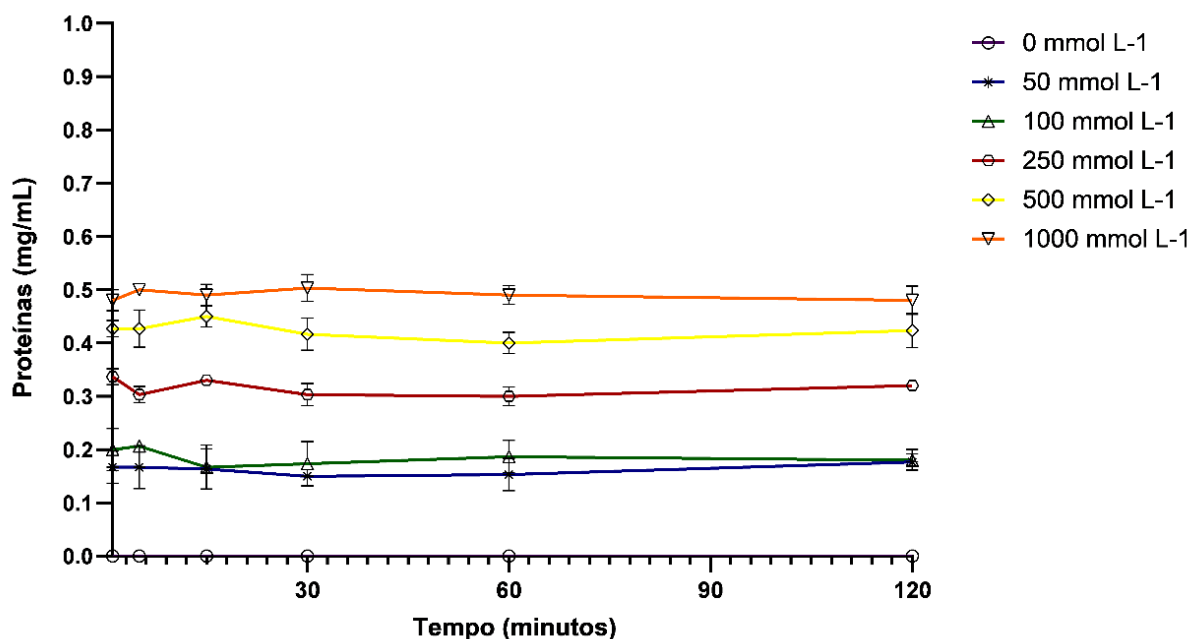


Figura 9. Concentração de proteína no sobrenadante após o tratamento de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* com NaOH a diferentes concentrações e tempos de incubação a temperatura ambiente.

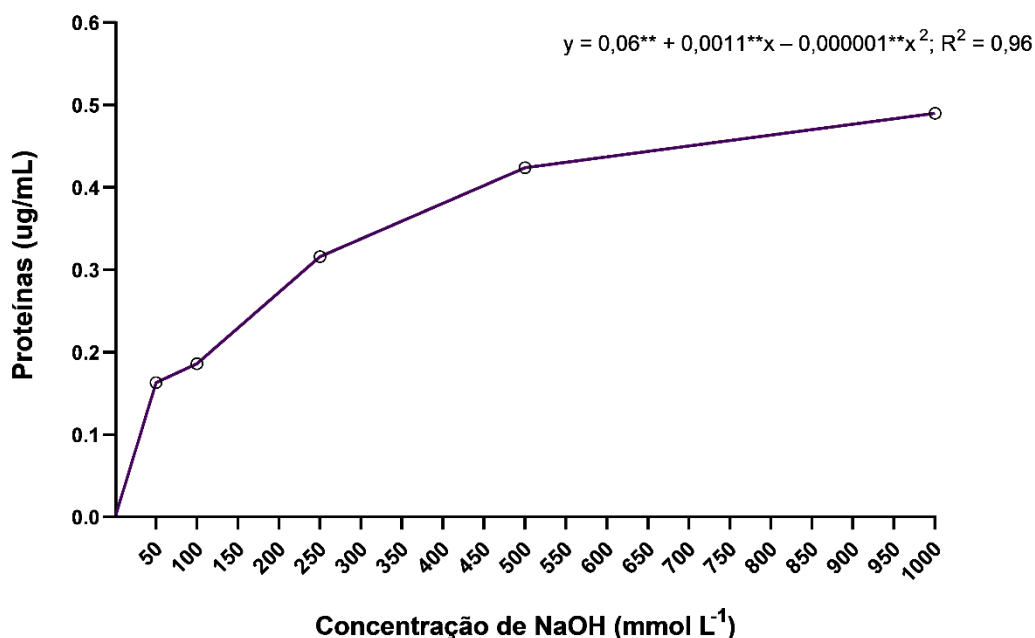


Figura 10. Concentração de proteína no sobrenadante após tratamentos de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* em função da concentração de NaOH. Equação de regressão representativa de modelo quadrático significativo ajustado aos dados.

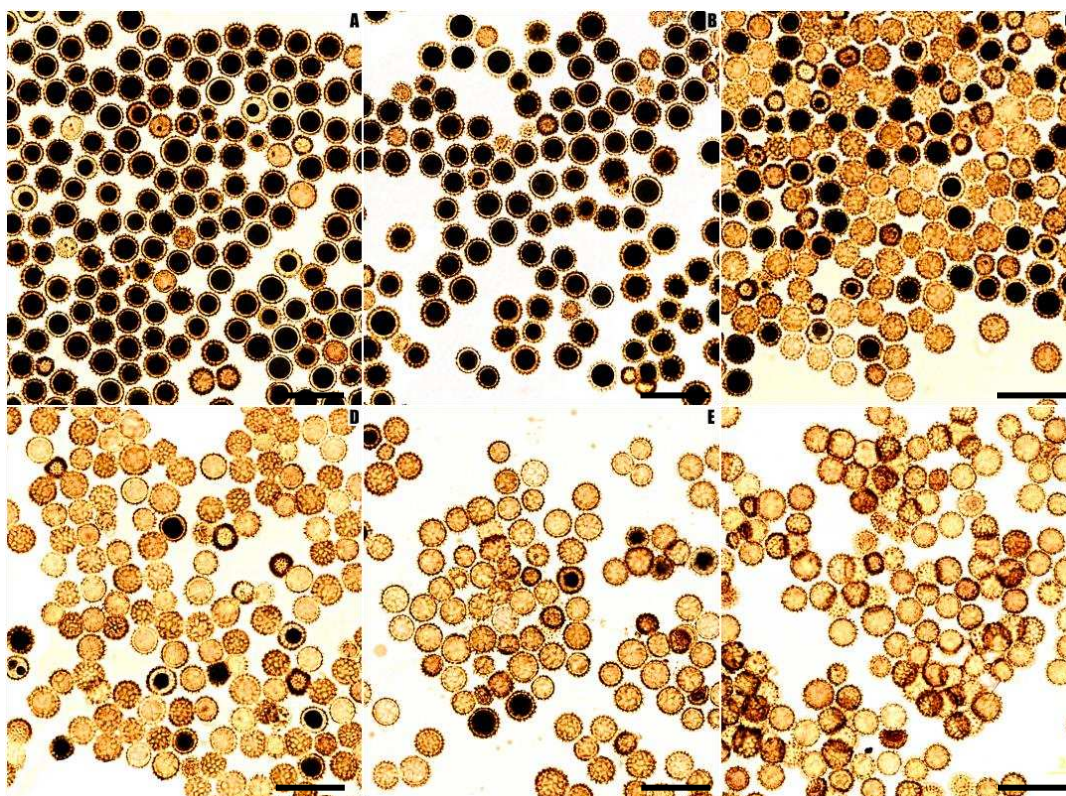


Figura 11. Basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* corados com Sudan Black B após permeabilização com diferentes concentrações de NaOH por 1 minuto. (A) 1000 mmol L⁻¹. (B) 500 mmol L⁻¹. (C) 250 mmol L⁻¹. (D) 100 mmol L⁻¹. (E) 50 mmol L⁻¹. (F) Controle: 0 mmol L⁻¹. Barras: 20 μ m.

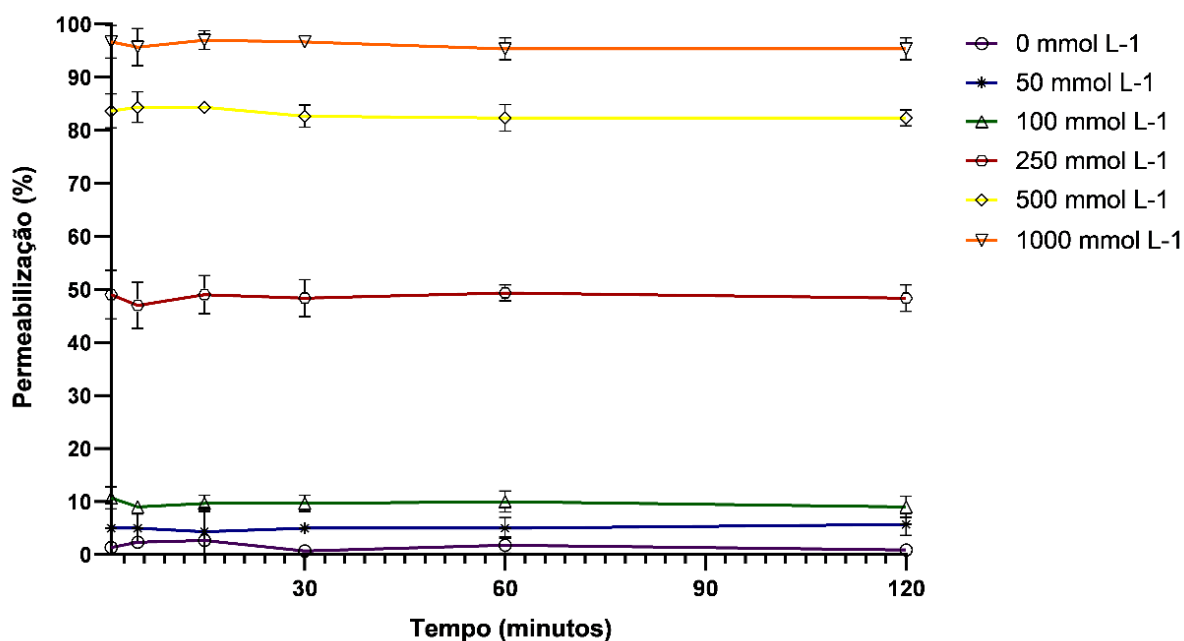


Figura 12. Percentual de permeabilização de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* tratados com NaOH a diferentes concentrações e tempos de incubação à temperatura ambiente.

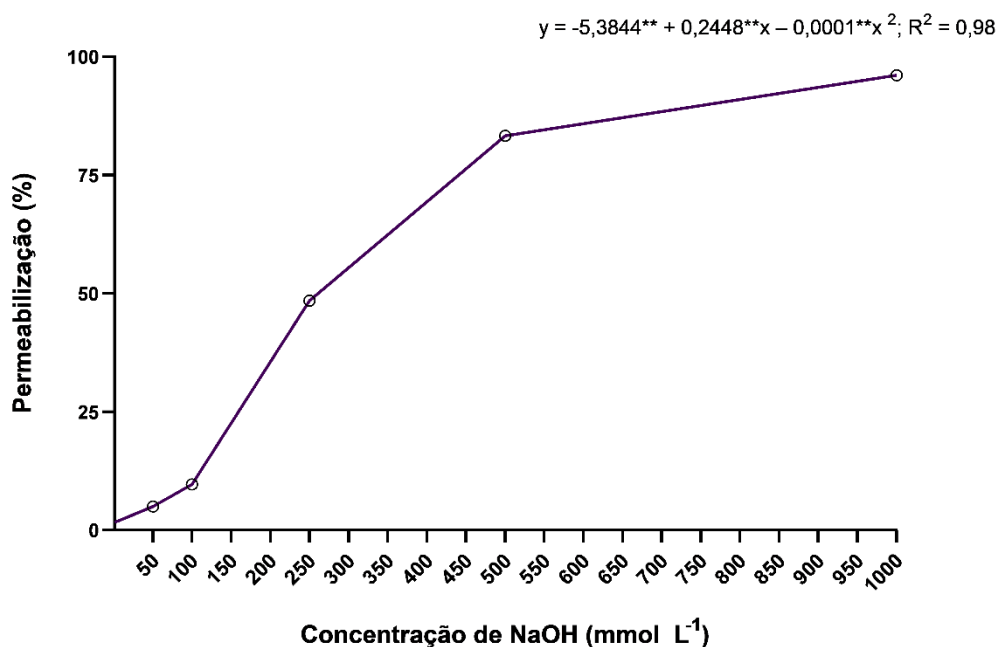


Figura 13. Percentual de permeabilização de basidiósporos de *P. microcarpus* após tratamentos, em função da concentração de NaOH. Equação de regressão representativa de modelo quadrático significativo ajustado aos dados.

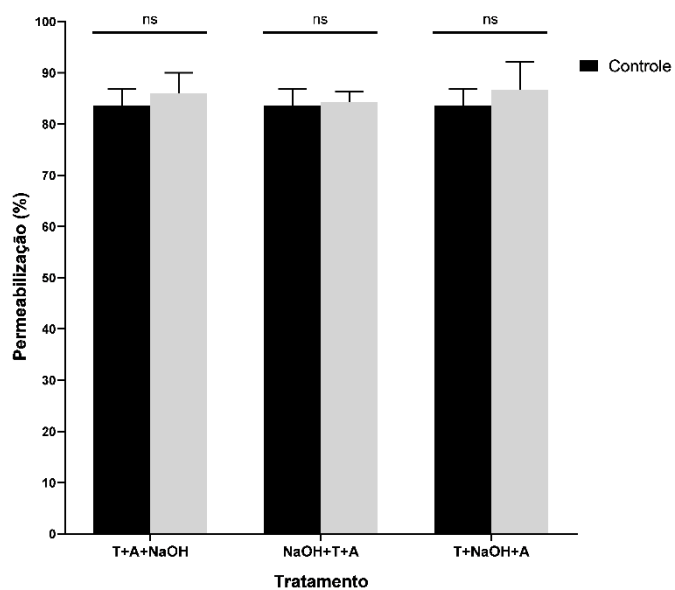


Figura 14. Percentual de basidiósporos de *P. microcarpus* permeabilizados sequencialmente com NaOH a 500 mmol L⁻¹ por um min, Triton X-100 a 1 % por 60 min (T) e ácido metanoico a 5 % por 1 min (A), em diferentes ordens. ns = não significativo pelo teste de Tukey a 5%.

4.2. Permeabilização enzimática

Os tratamentos com Lyzing Enzymes, Driselase e Lyzing Enzymes + Driselase não promoveram a permeabilização dos basidiósporos tratados com 0 e 50 mmol L⁻¹ de NaOH, independente das concentrações de enzimas testadas (Figuras 15, 16 e 17). Os tratamentos com Lyzing Enzymes (15 mg mL⁻¹), Driselase (15 mg mL⁻¹) e com Lyzing Enzymes + Driselase (15 mg mL⁻¹ + 15 mg mL⁻¹) não promoveram aumentos significativos na permeabilização dos basidiósporos (Figuras 15). No entanto, foram observadas tendências de aumento da permeabilização com o uso de Lyzing Enzymes (Figura 16).

O tratamento com Lyzing Enzymes na concentração 30 mg mL⁻¹ aumentou as porcentagens de basidiósporos permeabilizados em 7,3 e 8,1 % após os tratamentos de permeabilização prévios com NaOH a 100 e 250 mmol L⁻¹, respectivamente (Figura 16). Com a concentração de Lyzing Enzymes de 60 mg mL⁻¹, as porcentagens de basidiósporos foram significativamente aumentadas em 7,7, 9,3 e 6,3 % para os tratamentos com NaOH a 100, 250 e 500 mmol L⁻¹, respectivamente (Figura 17). Não foram observadas alterações morfológicas na superfície dos basidiósporos submetidos à digestão enzimática. Não houve efeito significativo da interação entre as concentrações de NaOH e dos conjuntos enzimáticos testados.

4.3. Reprodutibilidade do método de permeabilização

O método de permeabilização com NaOH mostrou-se reprodutível quando aplicado em amostras compostas de basidiósporos oriundos de 9 áreas de coleta distintas (Figura 18). Não houve diferença significativa entre as porcentagens de basidiósporos permeabilizados nessas condições, independentemente das amostras compostas testadas (Figura 18).

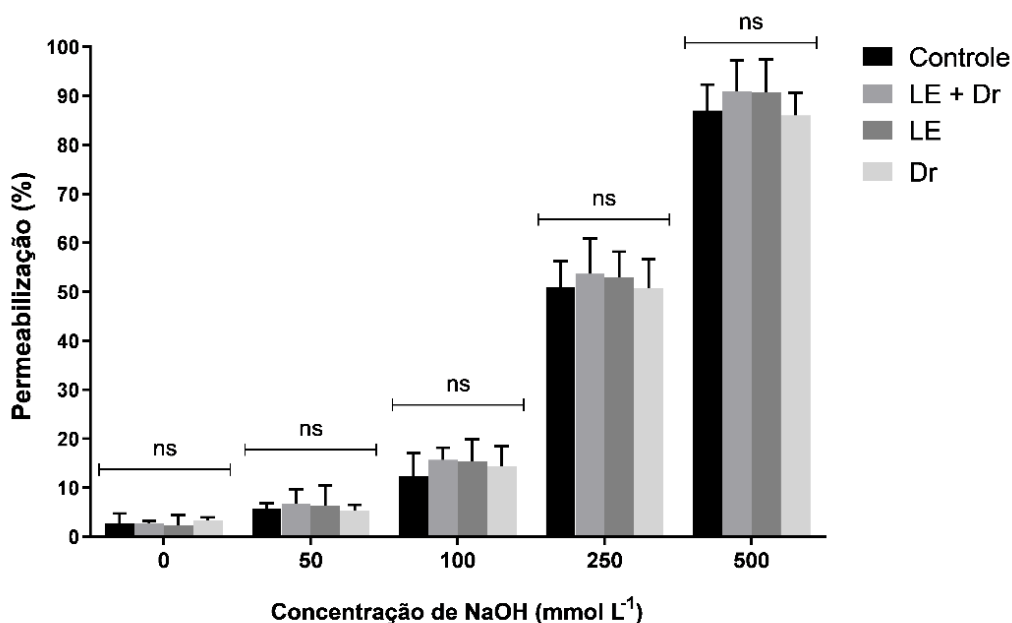


Figura 15. Percentual de basidiósporos de *P. microcarpus* permeabilizados com NaOH a diferentes concentrações e, posteriormente, submetidos à digestão com Lysing Enzymes (LE; 15 mg mL⁻¹), Driselase (Dr; 15 mg mL⁻¹) e LE + Dr (15 mg mL⁻¹ + 15 mg mL⁻¹). Controle = tratamento dos basidiósporos somente com NaOH na concentração correspondente. ns = não significativo pelo teste de Tukey a 5%

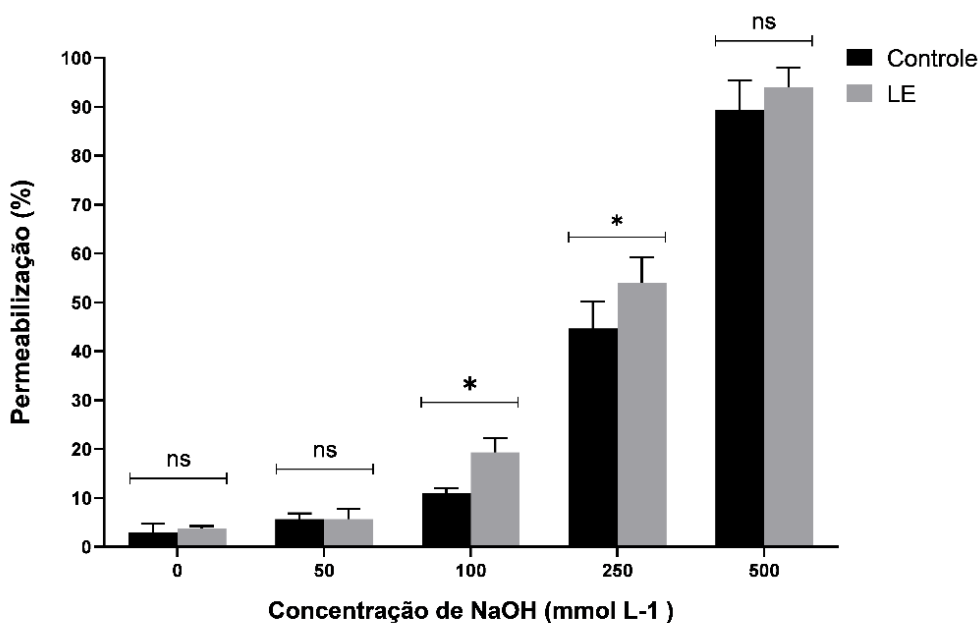


Figura 16. Percentual de basidiósporos de *P. microcarpus* permeabilizados com NaOH a diferentes concentrações e, posteriormente, submetidos à digestão com Lysing Enzymes (LE; 30 mg mL⁻¹). Controle: tratamento dos basidiósporos somente com NaOH na concentração correspondente. * = significativo pelo teste de Tukey a 5%. ns = não significativo.

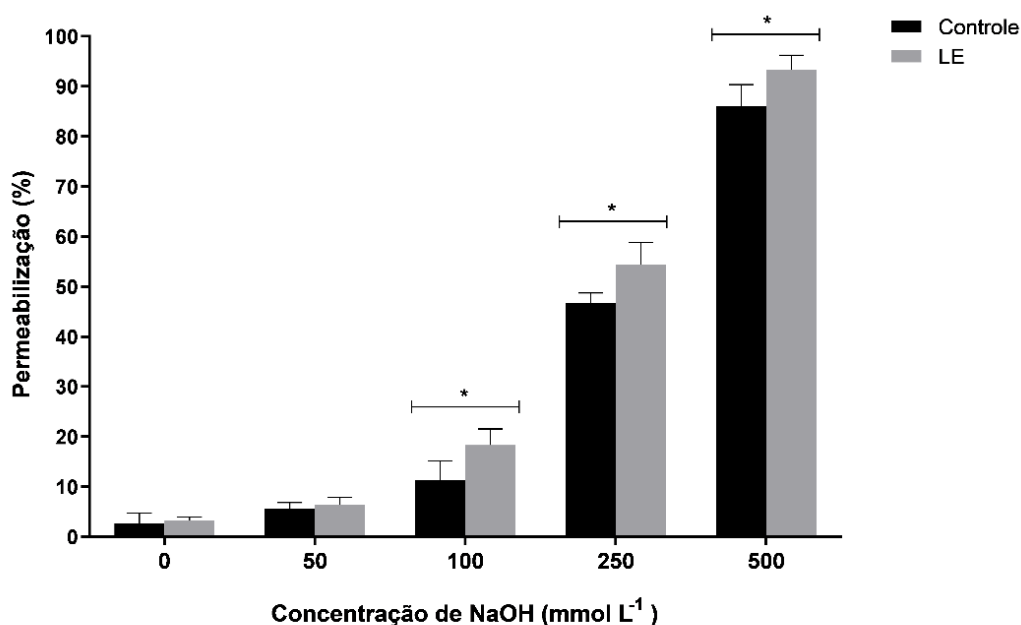


Figura 17. Percentual de basidiósporos de *P. microcarpus* permeabilizados com NaOH a diferentes concentrações e, posteriormente, submetidos à digestão com Lysing Enzymes (LE; 60 mg mL⁻¹). Controle: tratamento dos basidiósporos somente com NaOH na concentração correspondente. * = significativo pelo teste de Tukey a 5%. ns = não significativo.

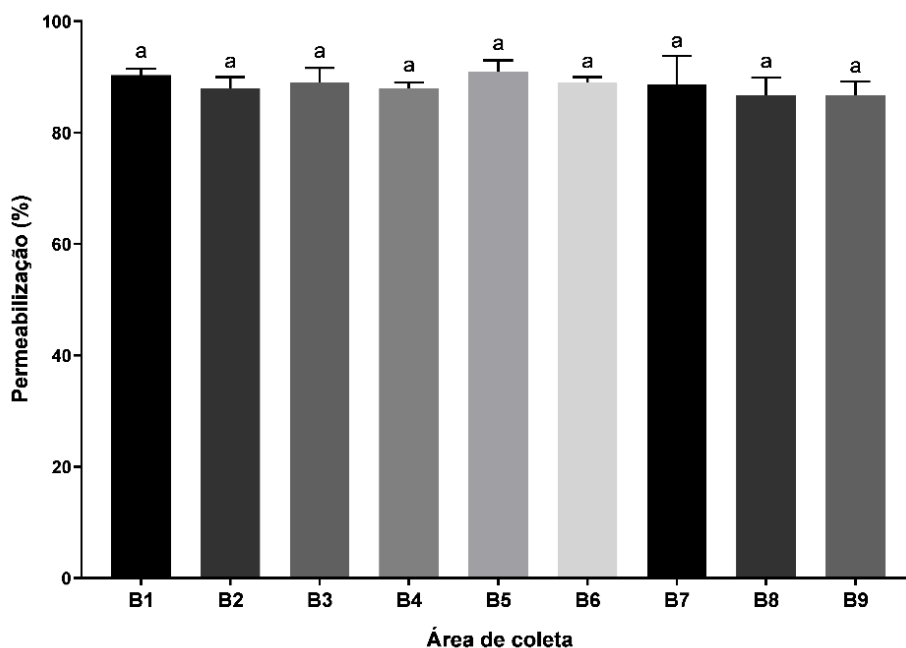


Figura 18. Porcentagem de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* permeabilizados, oriundos de 9 áreas de coleta distintas, após tratamento com NaOH a 500 mmol L⁻¹ e incubados por um minuto à temperatura ambiente. Barras com a mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.

4.4. Viabilidade dos basidiósporos permeabilizados

Após a aplicação dos tratamentos de permeabilização com NaOH a 100, 250, 500 e 1000 mmol L⁻¹ (Figura 19 A-D), por um minuto, ou das combinações de NaOH a 100, e 250 mmol L⁻¹ + Lysing Enzymes a 30 mg mL⁻¹, e de NaOH a 100, 250 e 500 mmol L⁻¹ + Lysing Enzymes a 60 mg mL⁻¹ (Figura 19 D-I), tratamentos esses onde houve a permeabilização, a viabilidade dos basidiósporos foi de 99,87 %. Os basidiósporos não permeabilizados não emitiram fluorescência (Figura 19 J) e os do controle, sem viabilidade, emitiram fluorescência vermelha (Figura 19 K).

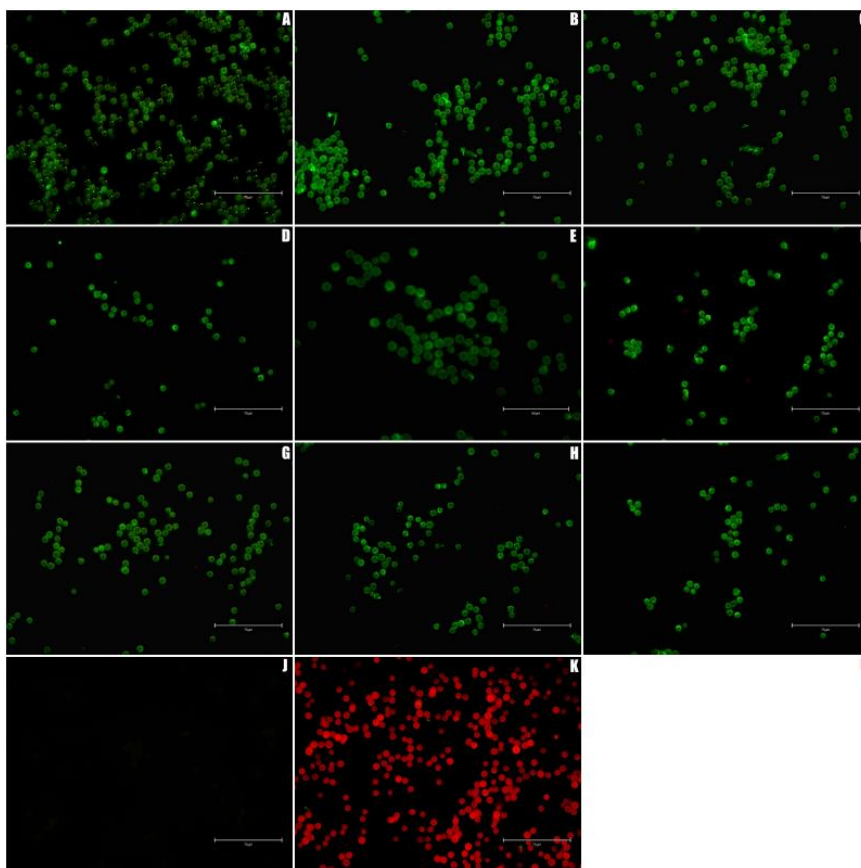


Figura 19. Basidiósporos de *P. microcarpus* submetidos a coloração com kit LIVE/DEAD™ FungaLight™ Yeast Viability. Basidiósporos viáveis apresentam coloração verde, enquanto que basidiósporos vermelhos são inviáveis (A) Basidiósporos permeabilizados com NaOH a 1000 mmol L⁻¹. (B) Basidiósporos permeabilizados com NaOH a 500 mmol L⁻¹. (C) Basidiósporos permeabilizados com NaOH a 250 mmol L⁻¹. (D) Basidiósporos permeabilizados com NaOH a 100 mmol L⁻¹. (E) Basidiósporos permeabilizados com NaOH a 250 mmol L⁻¹ e Lysing Enzyme (30 mg/mL). (F) Basidiósporos permeabilizados com NaOH a 100 mmol L⁻¹ e Lysing Enzymes (30 mg/mL). (G) Basidiósporos permeabilizados com NaOH a 500 mmol L⁻¹ e Lysing Enzyme (60 mg/mL). (H) Basidiósporos permeabilizados com NaOH a 250 mmol L⁻¹ e Lysing Enzymes (60 mg/mL). (I) Basidiósporos permeabilizados com NaOH a 100 mmol L⁻¹ e Lysing Enzymes (60 mg/mL). (J) Basidiósporos não permeabilizados. Notar que esporos não permeabilizados não emitem fluorescência. (K) Controle morto. Notar que esporos com a membrana plasmática danificada emitem fluorescência vermelha. Barras: 75 μm.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi possível desenvolver protocolo de permeabilização de basidiósporos de *P. microcarpus* com o uso de NaOH. O método mostrou-se altamente reprodutível, eficiente e capaz de manter alta viabilidade dos propágulos fúngicos. Os resultados ora obtidos são especialmente importantes para o desenvolvimento de inoculantes à base de basidiósporos e para a produção de estirpes monocarióticas destinadas a estudos de genética quantitativa, mutagênese e transformação (Costa *et al.*, 2003, Silvério *et al.*, 2021).

Triton X-100 e ácido metanoico foram capazes de remover pigmentos e proteínas, respectivamente, dos basidiósporos fúngicos. No entanto, esses compostos não melhoraram as porcentagens de permeabilização. Os valores de absorbância medidos a 475 nm indicam a presença de pigmentos que absorvem mais luz próximo a esse comprimento de onda, emitindo no comprimento de onda complementar, de cor amarela ou laranja (Minguez-Mosquera *et al.*, 1991). A presença de pigmentos derivados do ácido pulvínico de coloração amarela ou alaranjada, norbadiona A, badiona A e pisoquinona, já foi demonstrada em *Pisolithus* (Gill & Kiefel, 1994; Câmara, 2019). No entanto, nossos resultados sugerem que esses pigmentos têm pouca ou nenhuma influência na susceptibilidade dos basidiósporos à permeabilização.

Os maiores valores de absorbância medidos a 350 nm, nos tratamentos com Triton X-100 e NaOH, podem indicar a extração de melaninas fúngicas, as quais absorvem mais luz na faixa do ultravioleta, diminuindo com o aumento do comprimento de onda (Suwannarach *et al.*, 2019). A extração de melaninas fúngicas com NaOH apresenta bom desempenho (Suwannarach *et al.*, 2019). Esses pigmentos reduzem a permeabilidade da parede celular (Montjin *et al.*, 1997; Jacobson & Ikeda, 2005; Kogej *et al.* 2007). Interessantemente, no presente trabalho, foram observadas correlações diretas e significativas (0,6841; $p < 0,05$) entre a quantidade de pigmentos removidos, medidos a 350 nm, pelo NaOH e as porcentagens de basidiósporos permeabilizados por esse agente.

O tratamento dos basidiósporos com ácido metanoico e NaOH resultaram na liberação de proteínas para o sobrenadante. Já os tratamentos com Triton X-100, a

35 °C, não foram eficientes para a remoção dessas moléculas da parede celular. Tratamentos com surfactantes com a finalidade de extrair proteínas ancoradas por ligações fracas a frações de parede celular purificadas, fazem uso de altas temperaturas [100 °C] (Pitarch *et al.*, 2008). Essa diferença pode explicar a ineficiência do surfactante na extração desses compostos no presente trabalho. No entanto, a temperatura de 35 °C foi escolhida com a finalidade de se preservar a viabilidade dos basidiósporos. Alternativamente, proteínas ancoradas à parede por ligações fracas podem não estar presentes nos basidiósporos. De fato, a presença desse grupo de moléculas, a exemplo das hidrofobinas da classe II, não foi observada na parede celular de hifas de *Pisolithus tinctorius* (Tagu *et al.*, 1996; Tagu *et al.*, 2000).

O ácido metanoico foi capaz de remover proteínas dos basidiósporos. O uso desse composto foi baseado na capacidade do mesmo em desestruturar e extrair hidrofobinas da classe I da parede celular fúngica (Wessels *et al.*, 1991; Ren *et al.*, 2013). As hidrofobinas da classe I são constituintes da parede celular de hifas do fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Tagu *et al.*, 1996; Tagu *et al.*, 2000; Duplessis *et al.*, 2001). Da mesma forma, a expressão de genes que codificam hidrofobinas já foi relatada durante toda a basidiosporogênese de *P. microcarpus* (Pereira *et al.*, 2017). Haja vista a localização superficial da hidrofobinas (Wessels *et al.*, 1991; Tagu *et al.*, 1996), a imediata quebra da tensão superficial dos basidiósporos pelo pré-tratamento com Triton X-100 a 0,5 % e a não permeabilização dos esporos nos tratamentos com Triton X-100 e ácido metanoico, hipotetizamos que as hidrofobinas não contribuem de forma significativa para a recalcitrância dos basidiósporos de *P. microcarpus*.

O NaOH foi o agente mais eficiente na remoção de proteínas. Soluções alcalinas são eficientes na remoção de manoproteínas, componentes altamente conservados nas paredes celulares fúngicas (Pitarch *et al.*, 2008; Gow *et al.*, 2017). As manoproteínas são moléculas hidrofóbicas, estão ancoradas de forma variada na parede celular fúngica e contribuem para a impermeabilização dessa estrutura (Silva Araújo *et al.*, 2014). É possível que a remoção parcial desse grupo de moléculas tenha sido efetuada pelo NaOH, resultando nas porcentagens de permeabilização de até 97 % dos basidiósporos. De fato, foi observada alta correlação (0,9485; $p < 0,05$) entre a quantidade de proteínas extraídas com NaOH e as porcentagens de permeabilização obtidas com esse agente.

O NaOH foi capaz de permeabilizar os basidiósporos de *P. microcarpus* sem a necessidade de tratamento prévio com Triton X-100 e, ou ácido metanoico. Da mesma

forma, a aplicação desses agentes após o tratamento com NaOH não aumentou a permeabilização promovida por essa base.

Os percentuais de permeabilização da parede celular de basidiósporos de *P. microcarpus* tratados com NaOH foram similares aos obtidos com os tratamentos à base de água sanitária (Godinho, 2012; Silvério *et al.*, 2021). No entanto, o uso do produto comercial resultou em diferentes eficiências quando aplicado à basidiósporos oriundos de distintos basidiomas (Silvério *et al.*, 2021). O método ora proposto, consistindo da permeabilização dos basidiósporos com NaOH, mostrou-se reprodutível, promovendo porcentagens de permeabilização estatisticamente semelhantes para amostras compostas de basidiósporos oriundos de 9 áreas distintas de coleta dos basidiomas. O uso de reagentes químicos analíticos no presente trabalho eliminou as variações inerentes da composição das marcas de água sanitária comerciais testadas por Silvério *et al.* (2021).

Lysing Enzymes foi eficaz em promover aumentos na porcentagem de basidiósporos permeabilizados após o tratamento prévio com NaOH. Os aumentos obtidos variaram de 6,3 a 9,3 %, a depender da concentração do produto enzimático. Constatou-se que a remoção de pigmentos e proteínas da parede celular dos basidiósporos de *P. microcarpus* pelo NaOH foi necessária para a atuação das enzimas líticas sobre a parede celular fúngica, com ganhos de permeabilização. Ganhos adicionais na permeabilização poderão ser obtidos pelo aumento das concentrações das enzimas líticas, do tempo de digestão e de uma remoção mais eficaz de pigmentos e proteínas, além de outros compostos que contribuem para a baixa permeabilidade da parede celular dos basidiósporos.

O elevado percentual de viabilidade dos basidiósporos permeabilizados indica que as condições utilizadas para o tratamento da parede celular desses propágulos foram brandas, não ocasionando danos a membrana plasmática dos propágulos fúngicos. Esses valores de viabilidade medidos para os basidiósporos permeabilizados de *P. microcarpus* são semelhantes aos valores relatados para outras espécies de basidiomicetos, a exemplo de *Pleurotus ostreatus* (> 99%), *Marasmius oreades* (> 99 %), *Rhizopogon subcaerulescens* (92 %) e *Suillus brevipes* (80 %) [Miller *et al.*, 1993]. Os dados de viabilidade obtidos no presente trabalho corroboram a hipótese de que as baixas taxas de germinação dos basidiósporos de *P. microcarpus* não são causadas por falta de condições internas necessárias ao

processo de germinação (Campos *et al.*, 2008; Campos & Costa 2010a; Campos & Costa, 2010b; Pereira *et al.*, 2017).

As porcentagens de viabilidade dos basidiósporos aqui obtida foram superiores às relatadas por Godinho (2012) e Silvério *et al.* (2021), que usaram água sanitária comercial para a permeabilização dos esporos. Esses autores relataram porcentagens de viabilidade de, no máximo, 80 %. O hipoclorito de sódio, componente da água sanitária comercial, é forte agente oxidante, ocasionando danos às estruturas celulares com a consequente perda de viabilidade (Kwolek-Mirek *et al.*, 2011).

Mesmo que a escarificação química testada tenha permitido a maior atuação das enzimas líticas sobre a parede celular dos basidiósporos, a mesma mostrou-se ainda robusta o suficiente, não havendo a liberação de protoplastos, esferoplastos ou outras alterações visíveis na sua estrutura. Além disso, a maior ação de Lyzing Enzymes sobre a parede celular, após o tratamento dos basidiósporos com NaOH, não provocou danos à membrana citoplasmática dos basidiósporos, mesmo na maior concentração de 60 mg mL⁻¹.

Não foi possível, neste trabalho, avaliar a porcentagem de germinação dos basidiósporos permeabilizados. A germinação desses propágulos é demorada, levando de 20 a 70 dias para o aparecimento de colônias *in vitro*, na presença de plântulas hospedeiras (Costa 2002; Costa *et al.*, 2003; Pereira, 2004). Espera-se que, com o tratamento de permeabilização desenvolvido, os basidiósporos possam germinar em menor tempo e em maiores porcentagens, facilitando a produção de inoculantes e a colonização do sistema radicular da planta hospedeira. O desenvolvimento de inoculantes à base de basidiósporos é de relevância para o Brasil, uma vez que o país detém extensas área plantadas com eucalipto (IBÁ, 2020), plantas que se encontram frequentemente associadas a *P. microcarpus* em campo (Chambers & Cairney, 1999; Costa, 2002; Cairney, 2002; Kasuya *et al.*, 2010).

A permeabilização da parede celular dos basidiósporos pode facilitar a entrada na célula de compostos indutores da germinação, tais como ácidos orgânicos, flavonoides, açúcares redutores e hormônios vegetais (Fries *et al.*, 1987; Lagrange *et al.*, 2001; Costa 2002; Costa *et al.*, 2003; Pereira, 2004; Deveau *et al.*, 2012), facilitando a obtenção de isolados monocarióticos destinados aos estudos de genética quantitativa da associação ectomicorrízica, transformação e mutagênese (Rosado, 1993; Costa *et al.*, 2003).

6. CONCLUSÕES

Desenvolveu-se método de permeabilização de basidiósporos de *P. microcarpus*, de alta reprodutibilidade e capaz de conservar a viabilidade dos basidiósporos fúngicos.

O NaOH foi o agente capaz de remover pigmentos e proteínas da parede celular e provocar a permeabilização dos basidiósporos.

Os coquetéis enzimáticos testados não foram capazes de promover a permeabilização dos basidiósporos isoladamente. No entanto, tratamento prévio com NaOH favoreceu a atuação do Lysing Enzymes, causando elevação no percentual permeabilizado com os tratamentos combinados.

O método desenvolvido tem o potencial de melhorar as porcentagens de germinação dos basidiósporos de *P. microcarpus*, facilitando a obtenção de estirpes monocarióticas e o desenvolvimento de inoculantes ectomicorrízicos.

REFERÊNCIAS

- Aggangan, N. S., Moon, H. K., Han, S. H. Growth response of *Acacia mangium* Willd. seedlings to arbuscular mycorrhizal fungi and four isolates of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker and Couch. **New Forests**, v. 39, n. 2, p. 215-230, 2010.
- Alberton, O., Aguiar, D., Gimenes, R. M. T., Carrenho, R. Meta-analysis for responses of eucalyptus and pine inoculated with ectomycorrhizal fungi in Brazil. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 12, n. 2, p. 1159-1163, 2014.
- Albrecht, C., Burgess, T., Dell, B., Lapeyrie, F. Chitinase and peroxidase activities are induced in eucalyptus roots according to aggressiveness of Australian ectomycorrhizal strains of *Pisolithus* sp. **New Phytologist**, v. 127, n. 2, p. 217-222, 1994.
- Alves, R., Preto, M., Vasconcelos, V., Oliveira, R. S., Martins, R. Cytotoxicity Induced by Extracts of *Pisolithus tinctorius* Spores on Human Cancer and Normal Cell Lines—Evaluation of the Anticancer Potential. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 78, n. 13-14, p. 840-847, 2015.
- Barrett, V., Lemke, P. A., Dixon, R. K. Protoplast formation from selected species of ectomycorrhizal fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 381-387, 1989.
- Bauman, J. M., Francino, S., Santas, A. Interactions between ectomycorrhizal fungi and chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*) on American chestnut (*Castanea dentata*) used in coal mine restoration. **AIMS microbiology**, v. 4, n. 1, p. 104, 2018.
- Boa, E. R. Wild edible fungi: a global overview of their use and importance to people. **FAO**, 2004.
- Bowman, S. M., Free, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **Bioessays**, v. 28, n. 8, p. 799-808, 2006.
- Britton, G. **The biochemistry of natural pigments**. Cambridge University Press, 1983.
- Brownlee, C., Duddridge, J. A., Malibari, A., Read, D. J. The structure and function of mycelial systems of ectomycorrhizal roots with special reference to their role in forming inter-plant connections and providing pathways for assimilate and water transport. In: **Tree root systems and their mycorrhizas**. Springer, Dordrecht, p. 433-443, 1983.
- Brundrett, M. C., Tedersoo, L. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. **New Phytologist**, v. 220, n. 4, p. 1108-1115, 2018.
- Bulmer, G. S. Spore germination of forty-two species of puffballs. **Mycologia**, p. 630-632, 1964.

- Cairney, J. W. Pisolithus: death of the pan-global super fungus. **New Phytologist**, p. 199-201, 2002.
- Camara, A. G. D. N., Análise comparativa de pigmentos do fungo *Pisolithus tinctorius* de diferentes procedências. 2019.
- Camara, A. G. N. Análise comparativa de pigmentos do fungo *Pisolithus tinctorius* de diferentes procedências. **UFV**. 2019.
- Campos, A. N. R., Costa, M. D. Basidiosporogenesis, meiosis, and post-meiotic mitosis in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 47, n. 5, p. 477-483, 2010b.
- Campos, A. N. R., Costa, M. D. Histochemistry and storage of organic compounds during basidiosporogenesis in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1745-1753, 2010a.
- Campos, A. N. R., Costa, M. D., Tótola, M. R., Borges, A. C. Total lipid and fatty acid accumulation during basidiospore formation in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus* sp. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1531-1540, 2008.
- Carvalho, T. D., Rosado, S. C. S., de Souza T, A. M. produção de culturas monocarióticas e compatibilidade sexual intra e interpopulacional para o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*. **CERNE**, v. 3, n. 1, p. 143-160, 1997.
- Chambers, S. M., Cairney, J. W. G. *Pisolithus*. In: **Ectomycorrhizal Fungi Key Genera in Profile**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 1-31, 1999.
- Chaud, S. G., Sgarbieri, V. C. Propriedades funcionais (tecnológicas) da parede celular de leveduras da fermentação alcoólica e das frações glicana, manana e glicoproteína. **Food Science and Technology**, v. 26, p. 369-379, 2006.
- Ćirić-Marjanović, G., Trchová, M., Stejskal, J. The chemical oxidative polymerization of aniline in water: Raman spectroscopy. **Journal of Raman Spectroscopy: An International Journal for Original Work in all Aspects of Raman Spectroscopy, Including Higher Order Processes, and also Brillouin and Rayleigh Scattering**, v. 39, n. 10, p. 1375-1387, 2008.
- Coelho, I. D. S. Identificação de genes expressos durante a fase pré-simbiótica da associação ectomicorrízica entre *Hydnangium* sp. e *Eucalyptus grandis* e transformação de fungos ectomicorrízicos. 2008.
- Cole, G. T., Sekiya, T., Kasai, R., Yokoyama, T., Nozawa, Y. Surface ultrastructure and chemical composition of the cell walls of conidial fungi. **Experimental Mycology**, v. 3, n. 2, p. 132-156, 1979.
- Colpaert, J. V., Wevers, J. H., Krznic, E., Adriaensen, K. How metal-tolerant ecotypes of ectomycorrhizal fungi protect plants from heavy metal pollution. **Annals of Forest Science**, v. 68, n. 1, p. 17-24, 2011.

Corcobado, T., Moreno, G., Azul, A. M., Solla, A. Seasonal variations of ectomycorrhizal communities in declining *Quercus ilex* forests: interactions with topography, tree health status and *Phytophthora cinnamomi* infections. **Forestry: An International Journal of Forest Research**, v. 88, n. 2, p. 257-266, 2015.

Costa, M. D. Germinação de esporos e formação de ectomicorrizas in vitro por estirpes monocarióticas de *Pisolithus* sp. **UFV**. 2002.

Costa, M. D., Campos, A. N. D. R., Santos, M. L., Borges, A. C. In vitro ectomycorrhiza formation by monokaryotic and dikaryotic isolates of *Pisolithus microcarpus* in *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v. 34, n. 3, p. 377-387, 2010.

Dadachova, E., Casadevall, A. Ionizing radiation: how fungi cope, adapt, and exploit with the help of melanin. **Current opinion in microbiology**, v. 11, n. 6, p. 525-531, 2008.

De Vocht, M. L., Reviakine, I., Ulrich, W. P., Bergsma-Schutter, W., Wösten, H. A., Vogel, H., Robillard, G. T. Self-assembly of the hydrophobin SC3 proceeds via two structural intermediates. **Protein Science**, v. 11, n. 5, p. 1199-1205, 2002

de Vries, O. M., Fekkes, M. P., Wösten, H. A., Wessels, J. G. Insoluble hydrophobin complexes in the walls of *Schizophyllum commune* and other filamentous fungi. **Archives of Microbiology**, v. 159, n. 4, p. 330-335, 1993.

Deveau, A., Plett, J. M., Legué, V., Frey-Klett, P., Martin, F. Communication between plant, ectomycorrhizal fungi and helper bacteria. In: **Biocommunication of Fungi**. Springer, Dordrecht, 2012. p. 229-247.

Dighton, J. Phosphatase production by mycorrhizal fungi. **Plant and soil**, v. 71, n. 1, p. 455-462, 1983.

Domínguez-Núñez, J. A., Berrocal-Lobo, M., Albanesi, A. S. Ectomycorrhizal fungi: role as biofertilizers in forestry. In: **Biofertilizers for Sustainable Agriculture and Environment**. Springer, Cham, p. 67-82, 2019.

Duplessis, S., Sorin, C., Voiblet, C., Palin, B., Martin, F., Tagu, D. Cloning and expression analysis of a new hydrophobin cDNA from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus*. **Current Genetics**, v. 39, n. 5, p. 335-339, 2001.

Dutta, A. K., Acharya, K. Traditional and ethno-medicinal knowledge of mushrooms in West Bengal, India. **Asian J Pharm Clin Res**, v. 7, n. 4, p. 36-41, 2014.

F. Martin, F., Laurent, P., de Carvalho, D., Voiblet, C., Balestrini, R., Bonfante, P., Tagu, D. Cell wall proteins of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*: identification, function, and expression in symbiosis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, n. 2-3, p. 161-174, 1999.

Fernandez, C. W., Koide, R. T. The function of melanin in the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum* under water stress. **Fungal Ecology**, v. 6, n. 6, p. 479-486, 2013.

FLEET, G. H. Cell Walls. Rose AH and Harrison JS (Eds), *The Yeasts*, Vol. 4. 1991.

Fries, N., Serck-Hanssen, K., Dimberg, L. H., Theander, O. Abietic acid, and activator of basidiospore germination in ectomycorrhizal species of the genus *Suillus* (Boletaceae). **Experimental Mycology**, v. 11, n. 4, p. 360-363, 1987.

Funakoshi, Y., Suzuki, T. Glycobiology in the cytosol: the bitter side of a sweet world. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1790, n. 2, p. 81-94, 2009.

Galardis, M. M. B., Sánchez, R. C. L., Fall, F., Eichler-Löbermann, B., Pruneau, L., Bâ, A. M. Growth and physiological responses of ectomycorrhizal *Coccoloba uvifera* (L.) L. seedlings to salt stress. **Journal of Arid Environments**, v. 196, p. 104650, 2022.

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., Oliveira, V. L., Castellano, M. A., Trappe, J. M. GIACHINI, Admir J. et al. Ectomycorrhizal fungi in Eucalyptus and Pinus plantations in southern Brazil. **Mycologia**, v. 92, n. 6, p. 1166-1177, 2000.

Gill, M., Kiefel, M. J. Pigments of fungi. XXXVII. Pisolithone, a new naphthalenoid pulvinic acid from the fungus *Pisolithus arhizus*. **Australian Journal of Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 1967-1977, 1994.

Godinho, C. S. Compostos de reserva e permeabilização de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus*. 2011.

Gooday, G. W. Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. In: **Biochemistry of microbial degradation**. Springer, Dordrecht, p. 279-312, 1994.

Gow, N. A., Latge, J. P., Munro, C. A. The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. **Microbiology spectrum**, v. 5, n. 3, p. 5.3. 01, 2017.

Grazziotti, P. H., Siqueira, J. O., Moreira, F. M., Carvalho, D. Efeito de Zn, Cd e Cu no comportamento de fungos ectomicorrízicos em meio de cultura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, n. 4, p. 831-837, 2001.

Hébraud, M., Fèvre, M. Protoplast production and regeneration from mycorrhizal fungi and their use for isolation of mutants. **Canadian journal of microbiology**, v. 34, n. 2, p. 157-161, 1988.

Herrera-Martínez, A., Ruiz-Medrano, R., Galván-Gordillo, S. V., Toscano-Morales, R., Gómez-Silva, L., Valdés, M., Xoconostle-Cázares, B. A 2-component system is involved in the early stages of the *Pisolithus tinctorius*-*Pinus greggii* symbiosis. **Plant signaling & behavior**, v. 9, n. 5, p. e28604, 2014.

Hill, R. A., Wong-Bajracharya, J., Anwar, S., Coles, D., Wang, M., Lipzen, A., Plett, J. M. bscisic acid supports colonization of *Eucalyptus grandis* roots by the mutualistic ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus*. **New Phytologist**, v. 233, n. 2, p. 966-982, 2022.

Houlès, A., Gotty, K., Joussemet, F., Vincent, B., Hannibal, L., Patrois, M., Ducouso, M. The Nurse Plant *Acacia spirorbis* Enriches Ectomycorrhizal Community Composition of a Target Species: *Tristaniopsis calobuxus*. **Diversity**, v. 14, n. 2, p. 107, 2022.

Jacobson, E. S., Ikeda, R. Effect of melanization upon porosity of the cryptococcal cell wall. **Medical Mycology**, v. 43, n. 4, p. 327-333, 2005.

Kasuya, M. C. M., Coelho, I. D. S., Campos, D. T. D. S., Araújo; E. F. D., Tamai, Y., Miyamoto, T. Morphological and molecular characterization of *Pisolithus* in soil under eucalyptus plantations in Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 6, p. 1891-1898, 2010.

Kennedy, P. G., Gagne, J., Perez-Pazos, E., Lofgren, L. A., Nguyen, N. H. Does fungal competitive ability explain host specificity or rarity in ectomycorrhizal symbioses?. **PLoS one**, v. 15, n. 8, p. e0234099, 2020.

Klis, F. M., Ram, A. F. J., De Groot, P. W. J. A molecular and genomic view of the fungal cell wall. In: **Biology of the fungal cell**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 97-120. 2007.

Kogej, T., Stein, M., Volkmann, M., Gorbushina, A. A., Galinski, E. A., Gunde-Cimerman, N. Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea werneckii*: role of osmolytes and melanization. **Microbiology**, v. 153, n. 12, p. 4261-4273, 2007.

Kope, H. H., Fortin, J. A. Germination and comparative morphology of basidiospores of *Pisolithus arhizus*. **Mycologia**, v. 82, n. 3, p. 350-357, 1990.

Kumar, J., Atri, N. S. Studies on ectomycorrhiza: an appraisal. **The Botanical Review**, v. 84, n. 2, p. 108-155, 2018.

Kwan, A. H. Y., Winefield, R. D., Sunde, M., Matthews, J. M., Haverkamp, R. G., Templeton, M. D., Mackay, J. P. Structural basis for rodlet assembly in fungal hydrophobins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 10, p. 3621-3626, 2006.

Kwolek-Mirek, M., Bartosz, G., Spickett, C. M. Sensitivity of antioxidant-deficient yeast to hypochlorite and chlorite. **Yeast**, v. 28, n. 8, p. 595-609, 2011.

Lagrange, H., Jay-Allgmand, C., Lapeyrie, F. Rutin, the phenolglycoside from eucalyptus root exudates, stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentrations. **New Phytologist**, p. 349-355, 2001.

Lehto, T., Zwiazek, J. Ectomycorrhizas and water relations of trees: a review. **Mycorrhiza**, v. 21, n. 2, p. 71-90, 2011.

Liang, Y. U., Chen, H. U. I., Tang, M., Shen, S. Proteome analysis of an ectomycorrhizal fungus *Boletus edulis* under salt shock. **Mycological Research**, v. 111, n. 8, p. 939-946, 2007.

Lima, A. A., Baseia, I. G. Gasteroid fungi (Basidiomycota) from two protected natural areas in Rio Grande do Norte State, Brazil. **Journal of Fungal Biology**, v. 8, n. 6, p. 585-605, 2018.

Linder, M. B., Szilvay, G. R., Nakari-Setälä, T., Penttilä, M. E. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 5, p. 877-896, 2005.

Lofgren, L., Nguyen, N. H., Kennedy, P. G. Ectomycorrhizal host specificity in a changing world: can legacy effects explain anomalous current associations?. **New Phytologist**, v. 220, n. 4, p. 1273-1284, 2018.

Luo, Z. B., Wu, C., Zhang, C., Li, H., Lipka, U., Polle, A. The role of ectomycorrhizas in heavy metal stress tolerance of host plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 108, p. 47-62, 2014.

Macindoe, I., Kwan, A. H., Ren, Q., Morris, V. K., Yang, W., Mackay, J. P., Sunde, M. Self-assembly of functional, amphipathic amyloid monolayers by the fungal hydrophobin EAS. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 14, p. E804-E811, 2012.

Marx, D. H. Modified Melin-Norkrans Medium. **Phytopathology**, v. 59, p. 152-163, 1969.

Marx, D. H. Tree host range and world distribution of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 217-223, 1977.

Miller, S. L., Torres, P., McClean, T. M. Basidiospore viability and germination in ectomycorrhizal and saprotrophic basidiomycetes. **Mycological Research**, v. 97, n. 2, p. 141-149, 1993.

Mims, C. W. Ultrastructure of basidiospores of the mycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. **Canadian Journal of Botany**, v. 58, n. 14, p. 1525-1533, 1980.

Minguez-Mosquera, M., Rejano-Navarro, L., Gandul-Rojas, B., SanchezGomez, A. H., & Garrido-Fernandez, J. Color-pigment correlation in virgin olive oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 68, n. 5, p. 332-336, 1991.

Montijn, R. C., Van Wolven, P., De Hoog, S., Klis, F. M. β -Glucosylated proteins in the cell wall of the black yeast *Exophiala (Wangiella) dermatitidis*. **Microbiology**, v. 143, n. 5, p. 1673-1680, 1997.

Montijn, R. C., Van Wolven, P., De Hoog, S., Klis, F. M. β -Glucosylated proteins in the cell wall of the black yeast *Exophiala (Wangiella) dermatitidis*. **Microbiology**, v. 143, n. 5, p. 1673-1680, 1997.

Morris, V. K., Sunde, M. Formation of amphipathic amyloid monolayers from fungal hydrophobin proteins. In: **Protein Nanotechnology**. Humana Press, Totowa, NJ, p. 119-129. 2013.

Neba, G. A., Newbery, D. M., Chuyong, G. B. Limitation of seedling growth by potassium and magnesium supply for two ectomycorrhizal tree species of a Central

African rain forest and its implication for their recruitment. **Ecology and evolution**, v. 6, n. 1, p. 125-142, 2016.

Nicolás, C., Martin-Bertelsen, T., Floudas, D., Bentzer, J., Smits, M., Johansson, T., Tunlid, A. The soil organic matter decomposition mechanisms in ectomycorrhizal fungi are tuned for liberating soil organic nitrogen. **The ISME journal**, v. 13, n. 4, p. 977-988, 2019.

Nosanchuk, J. D., Stark, R. E., Casadevall, A. Fungal melanin: what do we know about structure?. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1463, 2015.

Op De Beeck, M., Troein, C., Peterson, C., Persson, P., Tunlid, A. Fenton reaction facilitates organic nitrogen acquisition by an ectomycorrhizal fungus. **New Phytologist**, v. 218, n. 1, p. 335-343, 2018.

Orwin, K. H., Kirschbaum, M. U., St John, M. G., Dickie, I. A. Organic nutrient uptake by mycorrhizal fungi enhances ecosystem carbon storage: a model-based assessment. **Ecology Letters**, v. 14, n. 5, p. 493-502, 2011.

Paolo, W. F., Dadachova, E., Mandal, P., Casadevall, A., Szaniszlo, P. J., Nosanchuk, J. D. Effects of disrupting the polyketide synthase gene WdPKS1 in *Wangiella* [*Exophiala*] *dermatitidis* on melanin production and resistance to killing by antifungal compounds, enzymatic degradation, and extremes in temperature. **BMC microbiology**, v. 6, n. 1, p. 1-16, 2006.

Pena-Vergara, G., Castro, L. R., Gasparetto, C. A., Bizzo, W. A. Energy from planted forest and its residues characterization in Brazil. **Energy**, v. 239, p. 122243, 2022.

Pereira, E., Coelho, V., Tavares, R. M., Lino-Neto, T., Baptista, P. Effect of competitive interactions between ectomycorrhizal and saprotrophic fungi on *Castanea sativa* performance. **Mycorrhiza**, v. 22, n. 1, p. 41-49, 2012.

Pereira, G. M. D. Germinação in vitro de esporos de *Pisolithus* sp. **UFV**, 2004.

Pereira, M. F., Campos, A. N. R., Anastacio, T. C., Morin, E., Brommonschenkel, S. H., Martin, F., Kohler, A., Costa, M. D. The transcriptional landscape of basidiosporogenesis in mature *Pisolithus microcarpus* basidiocarp. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 1-16, 2017.

Pitarch, A., Nombela, C., Gil, C. Collection of proteins secreted from yeast protoplasts in active cell wall regeneration. In: **2D PAGE: Sample Preparation and Fractionation**. Humana Press, 2008. p. 241-263.

Quirós, M., Gonzalez-Ramos, D., Tabera, L., Gonzalez, R. A new methodology to obtain wine yeast strains overproducing mannoproteins. **International journal of food microbiology**, v. 139, n. 1-2, p. 9-14, 2010.

Ren, Q., Kwan, A. H., Sunde, M. Two forms and two faces, multiple states and multiple uses: Properties and applications of the self-assembling fungal hydrophobins. **Peptide Science**, v. 100, n. 6, p. 601-612, 2013.

Rosado, S. C. D. Variations génétiques chez la symbiose ectomycorhizienne: *Pinus elliottii*-*Pisolithus tinctorius*. 1993.

Santos, M. L. Composição da parede celular dos fungos ectomicorrízicos *Pisolithus microcarpus* e *Pisolithus tinctorius*. 2007.

Schneider, E. F., Barran, L. R., Wood, P. J., Siddiqui, I. R. Cell wall of *Fusarium sulphureum*. II. Chemical composition of the conidial and chlamyospore walls. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 23, n. 6, p. 763-769, 1977.

Schoffemeer, E. A., Klis, F. M., Sietsma, J. H., Cornelissen, B. J. The cell wall of *Fusarium oxysporum*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, n. 2-3, p. 275-282, 1999.

Schrey, S. D., Erkenbrack, E., Früh, E., Fengler, S., Hommel, K., Horlacher, N., Tarkka, M. T. Production of fungal and bacterial growth modulating secondary metabolites is widespread among mycorrhiza-associated streptomycetes. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 1-14, 2012.

Shi, X., Yang, P., Peng, X., Huang, C., Qian, Q., Wang, B., Kuang, T. Bi-phase fire-resistant polyethylenimine/graphene oxide/melanin coatings using layer by layer assembly technique: Smoke suppression and thermal stability of flexible polyurethane foams. **Polymer**, v. 170, p. 65-75, 2019.

Silva Araújo, V. B., de Melo, A. N. F., Costa, A. G., Castro-Gomez, R. H., Madruga, M. S., de Souza, E. L., Magnani, M. Followed extraction of β -glucan and mannoprotein from spent brewer's yeast (*Saccharomyces uvarum*) and application of the obtained mannoprotein as a stabilizer in mayonnaise. **Innovative food science & emerging technologies**, v. 23, p. 164-170, 2014.

Silvério, M. A. M., Nascimento, J. M. D., Serrão, J. E., Tótola, M. R., Costa, M. D. Permeabilization, cell wall ultrastructure, and germination of basidiospores of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* treated with different commercial brands of bleach. **Revista Árvore**, v. 45, 2021.

Suwannarach, N., Kumla, J., Watanabe, B., Matsui, K., Lumyong, S. Characterization of melanin and optimal conditions for pigment production by an endophytic fungus, *Spissiomycetes endophytica* SDBR-CMU319. **PLoS One**, v. 14, n. 9, p. e0222187, 2019.

Szuba, A., Marczak, Ł., Kozłowski, R. Role of the proteome in providing phenotypic stability in control and ectomycorrhizal poplar plants exposed to chronic mild Pb stress. **Environmental Pollution**, v. 264, p. 114585, 2020.

Tagu, D., De Bellis, R., Balestrini, R., De Vries, O. M. H., Piccoli, G., Stocchi, V., Martin, F. Immunolocalization of hydrophobin HYDPT-1 from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius* during colonization of *Eucalyptus globulus* roots. **New Phytologist**, v. 149, n. 1, p. 127-135, 2000.

Tagu, D., Nasse, B., Martin, F. Cloning and characterization of hydrophobins-encoding cDNAs from the ectomycorrhizal Basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. **Gene**, v. 168, n. 1, p. 93-97, 1996.

Taniguchi, T., Yuzawa, T., HuiPing, M., Yamamoto, F., Yamanaka, N. Plantation soil inoculation combined with straw checkerboard barriers enhances ectomycorrhizal colonization and subsequent growth of nursery grown *Pinus tabulaeformis* seedlings in a dryland. **Ecological Engineering**, v. 163, p. 106191, 2021.

Tedersoo, L., May, T. W., Smith, M. E. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. **Mycorrhiza**, v. 20, n. 4, p. 217-263, 2010.

Tedersoo, L., May, T. W., Smith, M. E. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. **Mycorrhiza**, v. 20, n. 4, p. 217-263, 2010.

Velíšek, J., Cejpek, K. Pigments of higher fungi-a review. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 29, n. 2, p. 87-102, 2011.

Watling, R. A rain-forest *Pisolithus*: its taxonomy and ecology. **Nova Hedwegia**, v. 61, p. 417-429, 1995.

Wessels, J. G. Hydrophobins: proteins that change the nature of the fungal surface. **Advances in microbial physiology**, v. 38, p. 1-45, 1996.

Wessels, J. G., De Vries, O. M., Asgeirsdottir, S. A., Schuren, F. H. Hydrophobin genes involved in formation of aerial hyphae and fruit bodies in *Schizophyllum*. **The Plant Cell**, v. 3, n. 8, p. 793-799, 1991.

Zwiazek, J. J., Equiza, M. A., Karst, J., Senorans, J., Wartenbe, M., Calvo-Polanco, M. Role of urban ectomycorrhizal fungi in improving the tolerance of lodgepole pine (*Pinus contorta*) seedlings to salt stress. **Mycorrhiza**, v. 29, n. 4, p. 303-312, 2019.