

MERIELLE ANGÉLICA MARTINES SILVÉRIO

**PERMEABILIZAÇÃO E ULTRAESTRUTURA DA PAREDE CELULAR DE
BASIDIÓSPOROS DE *Pisolithus microcarpus***

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S587p
2013

Silvério, Merielle Angélica Martines, 1989-
Permeabilização e ultraestrutura da parede celular de
basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* / Merielle Angélica
Martines Silvério. – Viçosa, MG, 2013.
xiii, 38 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Maurício Dutra Costa.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 33-38.

1. Basidiósporos. 2. Hidrofobicidade. 3. Microscopia
eletrônica. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola. II. Título.

CDD 22 ed. 571.847

MERIELLE ANGÉLICA MARTINES SILVÉRIO

**PERMEABILIZAÇÃO E ULTRAESTRUTURA DA PAREDE CELULAR DE
BASIDIÓSPOROS DE *Pisolithus microcarpus***

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

APROVADA: 29 de outubro de 2013.

José Eduardo Serrão
(Coorientador)

Marcos Rogério Tótola
(Coorientador)

André Narvaes da Rocha Campos

Maurício Dutra Costa
(Orientador)

A Deus.

Aos meus pais: Mercedes, a flor mais linda do meu jardim
e Manoel, o melhor jardineiro.

Com todo amor, dedico.

*"Sois meu refúgio e minha cidadela,
meu Deus, em que eu confio."
Salmos: 90, 2-3.*

*"Te amar por quem não te ama.
Te adorar por quem não te adora.
Esperar por quem não espera em ti.
E pelos que não crêem, eu estou aqui."
Anjos de resgate*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por seu amor incondicional, por estar comigo em todos os momentos, por ser meu refúgio, supremo bem, força, alegria e esperança.

Aos meus pais, por todo amor dedicado, por toda ajuda, pelo exemplo de vida, pela educação e pelo esforço, que foram incentivo e estímulo para esta conquista.

Aos meus irmãos, por serem presentes de Deus que me fazem tão feliz.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, por me darem a melhor formação que eu poderia ter no mestrado.

Ao professor Maurício Dutra Costa, meu orientador, por toda ajuda, pela paciência, pela confiança e pelos ensinamentos.

Ao professor Marcos Rogério Tótola, pelo aprendizado durante o estágio em ensino sob sua avaliação.

Ao professor José Eduardo Serrão, por toda ajuda durante as análises de microscopia eletrônica.

Aos professores Arnaldo Chaer Borges e Célia Alencar de Moraes, pela atenção, pelo incentivo e pelos ensinamentos.

À Maria do Carmo Queiroz Fialho, ao Dihego Azevedo e aos funcionários do Núcleo de Microscopia e Microanálise, Artur e Karla, pela ajuda durante as análises de microscopia eletrônica.

A todos os amigos do Laboratório de Associações Micorrízicas, pelos laços de união que produziram benefícios mútuos entre mais de trinta e cinco pessoas; por terem me recebido tão bem, por toda ajuda, pela companhia maravilhosa e pela parceria que vivenciei todos os dias durante o mestrado. Levo vocês no coração.

À Maíra Mariz, Josi Duarte, Maíra de Freitas e Thalitinha Cardoso, pela ajuda nos experimentos da série "Pisolithiando".

Ao Gilberto Mendes (fera), por toda ajuda e apoio.

À Marliane Silva, Zé Maria Rodrigues, Bruno Coutinho, Mateus Dias, por serem exemplos de veteranos e por toda ajuda.

Às amigas-irmãs do mestrado, Ubiana Silva (ubiquinona), Kãmila Yuyama (japagirl), Maria Romerinha Silva e Livinha Gonzaga (RNA pol), por todos os momentos que passamos juntas e que nos uniram cada vez mais; pela felicidade de ter vocês por perto para superarmos todos os desafios.

A todos os amigos da família "Mindviridae", do Lab. Mind, pelo acolhimento e pela descoberta da espécie *Mind friendship virus*, que hospedou meu coração e provocou tantas alterações benéficas. Andrééé Xavier e Diiiêgo Rodrigues, pela amizade, pelo companheirismo e pelo afeto que vocês representam para mim.

Aos amigos Josi Santos (Bahêa) e Serginho Diaz, meus monitores de MBI 100 mais legais do mundo! E ao Léo Lopes, pela amizade, pela companhia, pela união, pela alegria e por todos os momentos inesquecíveis de descontração.

Aos alunos de MBI 100, pela oportunidade de experiência e de gratidão que tive passando esse período de estágio ensino com vocês, e ao Zé Carlos (Esquilo), pela dedicação, pela ótima convivência e por toda ajuda no laboratório.

Aos amigos Ubiana Silva (Ubii), Priiscila Gonçalves (Princesa), Léo (Rá), Andréé Xavier, Igoor Mendes e Gisely Barcelos (Gika), por terem sido anjos tantas vezes, por compartilharem o caminho ao lado dEle e terem escrito coisas tão belas em minha vida.

Aos amigos dos Laboratórios de Fisiologia, Ecologia, Genética, Petróleo e Biologia Celular, pelo ótimo convívio e pela disponibilidade em ajudar.

A todos os funcionários e técnicos do Departamento de Microbiologia, especialmente à Nilcéa, por terem cuidado tão bem de mim; à Cíntião Xavier e Camila Costa, pela amizade e ajuda no laboratório; ao Sr. Paulo da autoclave, pela ajuda e pelos conselhos tão sábios; ao Sr. Paulo da portaria, por abrir as portas do Bioagro e do dia para nós. À Rita, Hugo, Evandro e Danilo pela ajuda com os reagentes e equipamentos do laboratório.

Às amigas da república, Nicole, Kamila, Gabi, Ju, Marcela e Gi, pela ótima convivência que tivemos, por serem tão especiais.

À Dorinha Costa, por ter me acolhido como filha aqui em Viçosa, por toda ajuda, carinho e cuidado de sempre.

À Madalena, por ser exemplo de missionária, por ter me recebido tão bem, pela confiança e pela oportunidade que me deu de catequizar em Viçosa.

Aos professores do curso de Biologia da UCDB, por terem sido essenciais à minha formação.

À professora Francilina Araújo Costa, pela orientação na graduação e por todo apoio durante o mestrado.

Aos amigos Aline Coelho BBzão, Fer Silva, Susuca Nantes, Ana Carolina Araújo, Rogério Cáceres Latinha, Willian Breve QDM, Sergião Correa, Israel de Alencar, Gueisa Martins Morena, Carol Marchewicz Baby, May Barbosa, Edwin Torres, que, assim como minha família, também ficaram longe de Viçosa mas perto do meu coração. A todos que participaram de alguma forma deste trabalho, do meu dia-a-dia, dessa vitória. Contem sempre comigo.

BIOGRAFIA

MERIELLE ANGÉLICA MARTINES SILVÉRIO, filha de Manoel Silvério Filho e Mercedes Martines Gomes, nasceu no dia 4 de novembro de 1989, em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Iniciou o curso de Biologia em fevereiro de 2007 na Universidade Católica Dom Bosco, graduando-se bacharel e licenciada em dezembro de 2010. Em fevereiro de 2011, realizou trabalhos como bolsista de apoio técnico na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária e foi professora de biologia em escolas estaduais. Em agosto de 2011, iniciou o curso de mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, defendendo a dissertação em outubro de 2013.

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1. Micro-organismo e condições de armazenamento	9
3.2. Permeabilização de basidiósporos de <i>P. microcarpus</i> utilizando-se diferentes marcas de água sanitária	9
3.3. Permeabilização de basidiósporos oriundos de diferentes basidiocarpos	10
3.4. Análise da hidrofobicidade de basidiósporos	10
3.5. Otimização das condições de permeabilização da parede celular de basidiósporos de <i>P. microcarpus</i>	11
3.6. Microscopia eletrônica de varredura	11
3.7. Microscopia eletrônica de transmissão	12
3.8. Viabilidade de basidiósporos permeabilizados	12
3.9. Germinação <i>in vitro</i> de basidiósporos de <i>P. microcarpus</i>	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4.1. Permeabilização de basidiósporos utilizando-se diferentes marcas de água sanitária	14
4.2. Permeabilização de basidiósporos oriundos de diferentes basidiocarpos	16
4.3. Hidrofobicidade de basidiósporos após a permeabilização	18

4.4. Otimização das condições de permeabilização da parede celular de basidiósporos de <i>P. microcarpus</i>	18
4.5. Ultramorfologia da parede celular de basidiósporos após a permeabilização.....	21
4.6. Viabilidade de basidiósporos permeabilizados	25
4.7. Germinação de basidiósporos permeabilizados.....	28
5. CONCLUSÕES	31
6. REFERÊNCIAS.....	33

RESUMO

SILVÉRIO, Merielle Angélica Martines, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2013. **Permeabilização e ultraestrutura da parede celular de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus***. Orientador: Maurício Dutra Costa. Co-orientadores: José Eduardo Serrão e Marcos Rogério Tótola.

Basidiósporos do fungo ectomicorrízico *P. microcarpus* apresentam parede celular impermeável e hidrofóbica. Essas características estão possivelmente relacionadas às baixas porcentagens de germinação desses propágulos, dificultando a obtenção de monocários e a utilização desses esporos em inoculantes. O hipoclorito de sódio pode ser usado como agente permeabilizador da parede celular de esporos fúngicos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do tratamento de permeabilização com água sanitária sobre a ultraestrutura e hidrofobicidade da parede celular, a viabilidade e a capacidade de germinação de basidiósporos de *P. microcarpus*. Para isso, basidiósporos fúngicos, oriundos de corpos de frutificações associados a plantas de *Eucalyptus* spp., foram coletados e permeabilizados utilizando-se diferentes concentrações de água sanitária e tempos de exposição ao composto. Após a permeabilização, os basidiósporos foram analisados por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. A hidrofobicidade superficial, a viabilidade e a germinação desses propágulos também foram analisadas. A porcentagem de basidiósporos de *P. microcarpus* permeabilizados foi proporcional ao aumento na concentração de água sanitária e ao tempo de exposição. Basidiósporos oriundos de diferentes basidiocarpos diferiram de forma significativa na susceptibilidade ao tratamento de permeabilização com água sanitária e na redução da hidrofobicidade da superfície celular após esse tratamento. Alterações da ultraestrutura dos basidiósporos permeabilizados foram observadas nas concentrações de 15 e 50 % de

água sanitária pelo tempo de exposição de 40 s. Para um dos basidiocarpos avaliados e após a permeabilização com água sanitária a 5 % por 40 s, 80 % dos esporos permeabilizados encontravam-se viáveis. O inóculo dos basidiósporos permeabilizados com água sanitária a 10 % por 40 s resultou na produção de algumas colônias de *P. microcarpus*. As colônias apareceram após 15 dias de incubação dos basidiósporos permeabilizados na presença da planta hospedeira, *Eucalyptus citriodora*. A porcentagem de germinação obtida, 0,001%, foi semelhante àquelas relatadas na literatura para basidiósporos não-permeabilizados. Este trabalho é o primeiro relato sobre a ultraestrutura da parede celular dos basidiósporos de *P. microcarpus* e contribui para a compreensão da recalcitrância desses propágulos à germinação.

ABSTRACT

SILVÉRIO, Merielle Angélica Martines, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2013. **Permeabilization and ultrastructure of the cell wall of *Pisolithus microcarpus* basidiospores.** Adviser: Maurício Dutra Costa. Co-advisers: José Eduardo Serrão and Marcos Rogerio Tótola.

Basidiospores of the ectomycorrhizal fungus *P. microcarpus* are characterized by impermeable, hydrophobic cell walls. These features are possibly related to the low germination percentages of these propagules and make it difficult the isolation of monokaryons and the use of these spores as inoculants. Sodium hypochlorite can be used as a permeabilizing agent of the cell wall of fungal spores. The aim of this study was to evaluate the effects of permeabilization treatments with commercial bleach on the cell wall ultrastructure and hydrophobicity, and on the viability and germination of *P. microcarpus* basidiospores. For this, fungal basidiospores, from fruiting bodies associated with *Eucalyptus* spp., were collected and permeabilized using different concentrations of bleach and times of exposure. After permeabilization, the basidiospores were analyzed by scanning and transmission electron microscopy. Surface hydrophobicity, viability, and germination of these propagules were also analyzed. The percentage of permeabilized basidiospores of *P. microcarpus* was proportional to the increases in bleach concentration and the exposure time. Basidiospores from different fruiting bodies differed significantly in their susceptibility to the permeabilization treatments with bleach and in the decrease of cell surface hydrophobicity after permeabilization. Changes in the ultrastructure of permeabilized basidiospores were observed at bleach concentrations of 15 and 50 %, with an exposure time of 40 s. For one basidiocarp, after permeabilization with bleach at 5 % for 40 s, 80% of the permeabilized basidiospores were viable. The plating of basidiospores permeabilized with 10% bleach for 40 s resulted in the production of colonies of *P. microcarpus*. The colonies appeared after 15 days of incubation of the permeabilized

basidiospores in the presence of the host plant, *E. citriodora*. The germination percentage obtained, 0,001 %, was similar to those reported for non-permeabilized basidiospores. This work is the first report on the ultrastructure of the cell wall of basidiospores of *P. microcarpus* and contributes to the understanding of the recalcitrance of these propagules to germination.

1. INTRODUÇÃO

Fungos representantes do filo Basidiomycota são encontrados em praticamente todos os ecossistemas terrestres, habitats de água doce e marinhos. O gênero *Pisolithus*, pertencente a este filo, contém espécies de fungos ectomicorrízicos que possuem distribuição cosmopolita e estão entre as mais estudadas atualmente, em face da capacidade de se associar simbioticamente com raízes de algumas plantas arbóreas, promovendo o crescimento vegetal.

O uso de micélio vegetativo e de esporos são alternativas comumente aventadas na literatura para a introdução de fungos ectomicorrízicos em viveiros florestais. Esporos de *Pisolithus tinctorius* apresentam peculiaridades em sua morfologia, possuindo parede celular hidrofóbica e estratificada em várias camadas com propriedades distintas, que sugerem elevada resistência mecânica e química. Tal estrutura constitui uma barreira de permeabilidade à entrada de compostos estimuladores da germinação, dificultando o desenvolvimento de inoculantes ectomicorrízicos à base de esporos.

A germinação dos esporos de *Pisolithus* e de outros fungos ectomicorrízicos envolve a atividade de diferentes moléculas liberadas pela planta hospedeira. No entanto, a identidade e a quantidade desses compostos estimuladores da germinação ainda não foram completamente elucidadas. A influência de alguns ácidos orgânicos e de flavonóides sobre a germinação *in vitro* dos esporos de *Pisolithus* já foi estudada, com resultados ainda incipientes sobre o papel desses compostos em estimular o processo. É sugerido que a impermeabilidade da parede celular, associada ao conhecimento limitado sobre fatores físico-químicos que estimulam a germinação, expliquem a reduzida eficiência do processo *in vitro*.

Em trabalho recente, o tratamento dos basidiósporos por escarificação química com hipoclorito de sódio, visando romper a barreira de permeabilidade representada pela parede celular, promoveu a permeabilização dessa estrutura. A análise da eficiência desse processo em função da variação morfo-fisiológica dos basidiocarpos observada nas florestas brasileiras de eucalipto, bem como o conhecimento das conseqüências da permeabilização para a morfologia, hidrofobicidade e viabilidade dos esporos, poderão esclarecer a influência desses fatores na germinação *in vitro* de basidiósporos.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do tratamento de permeabilização da parede celular dos basidiósporos de *P. microcarpus* com água sanitária sobre a ultraestrutura e a hidrofobicidade da parede celular, a viabilidade dos esporos e a capacidade de germinação desses propágulos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As ectomicorrizas são associações simbióticas amplamente distribuídas no mundo, contribuindo para a promoção do crescimento vegetal e a mitigação de estresses bióticos e abióticos (Nelhs et al., 2007). Tais associações entre fungos do solo e raízes de plantas arbóreas são frequentes em espécies florestais de interesse econômico, a exemplo do eucalipto, que é importante para a economia de mais de 100 países, ocupando, atualmente, uma área plantada superior a 25 milhões de hectares. No Brasil, o eucalipto abastece a maior parte do setor industrial de base florestal (Silva, 2011).

Dentre os fungos que formam ectomicorrizas, destacam-se os do gênero *Pisolithus*, que se associam com raízes de várias espécies de plantas gimnospermas e angiospermas (Singla et al., 2004), sendo atualmente utilizados como organismos modelo no estudo das ectomicorrizas. Nessas associações, as interações físicas iniciais entre as hifas e o ambiente, incluindo a planta hospedeira, são mediadas pela parede celular (Martin et al., 1999), que sofre alterações em sua estrutura e composição durante o estabelecimento da simbiose (Peterson e Bonfante, 1994; Tagu et al., 1996). Durante a formação da ectomicorriza, a parede celular está envolvida principalmente na adesão à superfície da planta hospedeira (Kottke, 1997; Tagu e Martin, 2000), formação de estruturas que compõem o manto, interface simbiótica entre a rede de Hartig e as células radiculares (Peterson e Bonfante, 1994) e modulação das respostas de defesa do hospedeiro (Salzer et al., 1997).

Além de estar envolvida em vários aspectos da formação de ectomicorrizas, a parede celular exerce influência sobre várias funções vitais para a fisiologia do fungo, como a proteção contra mudanças na pressão osmótica, sinalização celular (Albertsheim e Prouty, 1975; Schoffelman et al., 1999; Bowman e Free, 2006), aderência a substratos,

interação com hospedeiros, compatibilidade vegetativa, reprodução, dispersão e sobrevivência (Schoffelman et al., 1999).

Os fungos possuem parede celular com estrutura distinta, composta de glicoproteínas e polissacarídeos, principalmente glicanas e quitina (Bowman e Free, 2006). A quitina é um polímero linear formado por moléculas de N-acetil glicosamina, unidas por ligações glicosídicas. As ligações β -1,4 desse polissacarídeo formam microfibrilas no espaço extracelular que contribuem para a rigidez da parede celular (Ruiz-Herrera et al., 1996). As glicoproteínas são proteínas modificadas pela ligação de oligossacarídeos durante sua translocação e secreção celular (Bowman e Free, 2006).

Duas categorias de proteínas da parede celular fúngica são comumente observadas: enzimas, a exemplo das quitinases, glucanases, peptidases, envolvidas com a síntese e a remodelagem dessa estrutura, e proteínas estruturais, envolvidas com a migração, adesão e fusão celular (Bowman e Free, 2006).

Entre as proteínas presentes na parede celular fúngica, destacam-se as hidrofobinas, que são proteínas pequenas e moderadamente hidrofóbicas que contêm oito resíduos de cisteína conservados (Kershaw e Talbot, 1998), sendo fortemente ligadas aos polímeros da parede celular (Vries et al., 1993).

A expressão diferencial de proteínas da parede celular de *P. tinctorius* (hidrofobinas, adesinas e manoproteínas) mostrou ser regulada durante os eventos morfogenéticos da formação da simbiose (Martin et al., 1999). Tais proteínas podem conferir hidrofobicidade à superfície celular, auxiliando na adesão ao hospedeiro e na agregação de hifas (Wösten et al., 1994), nas cascatas de sinalização intracelular e nas mudanças no citoesqueleto (Dean, 1997; Chaffin et al., 1998; Kershaw e Talbot, 1998). Em contrapartida, a deposição de proteínas hidrofóbicas na parede celular de esporos pode, também, contribuir para a impermeabilidade da superfície dos basidiósporos, influenciando negativamente o processo de germinação (Costa, 2002; Godinho, 2011).

Estudos citoquímicos evidenciaram que *P. tinctorius* (Lei et al., 1990) e outros fungos ectomicorrízicos (Dexheimer e Pargney, 1991; Peterson e Bonfante, 1994; Bonfante et al., 1998) apresentam a parede celular constituída por várias camadas de aparência variável. A análise ultraestrutural do processo de formação de basidiósporos de *P. tinctorius* utilizando microscopia eletrônica de varredura e transmissão (Mims, 1980) e técnicas de imunocitoquímica (Martin et al., 1999) permitiram o conhecimento de algumas características morfológicas da parede celular dos esporos dessa espécie durante o processo de desenvolvimento. Os basidiósporos maduros possuem parede

celular constituída de quatro camadas, sendo a mais externa elétron-densa, constituída de material floculento, provida de proteínas (hidrofobinas, manoproteínas, adesinas) e espículas em sua superfície. A camada mais interna é elétron-transparente e limitada pela camada exterior, tornando-se mais espessa progressivamente à medida que o esporo amadurece. Nela estão localizados os compostos responsáveis pela rigidez da parede celular, a saber, quitina e glicanas. A composição química das demais camadas de parede celular desse fungo permanece desconhecida.

Recentemente, em estudos com a espécie *P. microcarpus* visando a descrição do processo de basidiosporogênese e da meiose, foram verificadas mudanças no padrão de emissão de fluorescência dos basidiósporos ao longo do desenvolvimento, fato que foi atribuído à deposição de diferentes camadas de parede nos esporos (Campos & Costa, 2010a). Sugeriu-se que, semelhantemente a *P. tinctorius*, os basidiósporos de *P. microcarpus* possuem também quatro camadas de parede. Basidiósporos de *P. microcarpus* possuem diâmetro de 6 a 8 μm , e, quando maduros, apresentam ornamentação típica, contendo espículas rebotadas na superfície, que medem aproximadamente 1 μm (Campos & Costa, 2010a). Assim, a estrutura da parede celular, associada à sua hidrofobicidade, tem sido associada à recalcitrância dos basidiósporos à germinação (Pereira, 2004; Campos & Costa, 2010a; Godinho, 2011).

A composição química da parede celular do micélio de isolados de *P. tinctorius* (Martin et al., 1999; Santos, 2007) e *P. microcarpus* (Santos, 2007) mostrou a presença dominante de glicanas tipo β -1,4, β -1,3, quitina e hidrofobina (Martin et al., 1999). Diferentemente do micélio, pouco se conhece sobre a composição química da parede celular dos basidiósporos de *Pisolithus* spp.

Recentemente, verificou-se a presença de polissacarídeos e proteínas na parede celular dos basidiósporos de *Pisolithus* sp., sem maior detalhamento sobre a identidade química desses compostos (Campos & Costa, 2010b). A coloração desse local com calcoflúor indicou a presença de β -glicanas em um ponto discreto da parede, correspondente ao local de selagem do esterigma após a migração de organelas do basídio para o esporo (Campos & Costa, 2010a). Sugere-se que esse ponto, rico em β -glicanas, seja, também, o local de saída da hifa durante a germinação, representando região de menor resistência à entrada de compostos estimuladores da germinação e ou, à lise enzimática. Essa hipótese é corroborada pelos dados de microscopia de luz de

Pereira (2004), que mostram o surgimento da hifa sempre a partir de um único ponto da superfície dos esporos.

A germinação de esporos de fungos ectomicorrízicos tem sido estudada em várias espécies fúngicas, sendo geralmente baixas as percentagens de germinação relatadas na literatura (Bulmer et al., 1964; Lamb & Richards, 1974; Suzuki, 1978; Fries & Birraux, 1980; Birraux & Fries, 1981; Ohta, 1986; Fries et al., 1987; Ohta, 1988; Kope & Fortin, 1990; Carvalho et al., 1997; Costa, 2002). Para *Pisolithus*, a porcentagem de germinação varia de 0,001 a 0,38 % (Bulmer et al., 1964; Lamb & Richards, 1974; Kope & Fortin, 1990; Costa, 2002; Pereira, 2004). Em geral, a germinação *in vitro* de esporos maduros de *Pisolithus*, na presença de um ativador da germinação, é alcançada em algumas semanas, embora em baixas percentagens (Pereira, 2004).

A identidade e o número de compostos ativadores da germinação liberados pelas raízes das plantas permanecem desconhecidos na maioria dos casos. Algumas espécies de fungos ectomicorrízicos respondem a dois ou três ativadores da germinação de forma sinérgica (Fries et al., 1987). Geralmente, esses ativadores da germinação apresentam baixa massa molecular, sendo compostos relativamente estáveis que se difundem no meio, alcançando os esporos e induzindo-os a germinar (Birraux e Fries, 1981).

Ácidos orgânicos presentes na fração ácida do extrato de acículas de pinho, tais como os ácidos butírico, acético e propiônico, são estimuladores da germinação de esporos do fungo ectomicorrízico *Tricholoma matsutake* (Ohta, 1986). O ácido butírico é o mais eficiente, mas outras substâncias também têm efeito estimulatório (Ohta, 1986). A adição dos ácidos fumárico, succínico, láctico e cítrico estimularam significativamente a germinação dos basidiósporos de *Pisolithus* sp. (Pereira, 2004). Os mecanismos que explicam o estímulo propiciado por esses ácidos orgânicos à germinação dos esporos ainda são desconhecidos, sendo sugerido que os ácidos orgânicos possam funcionar como fonte de carbono mais facilmente metabolizável, provendo energia para posterior metabolização das reservas de lipídeo já existentes no esporo maduro (Pereira, 2004).

Os exsudatos radiculares são constituídos por complexa mistura de moléculas. Entretanto, não se sabe exatamente quais desempenham papel no desencadeamento e manutenção da sinalização entre os simbiontes. Os flavonóides são considerados moléculas candidatas ao papel de sinalizadoras por atuarem em outras interações planta-microrganismo, como por exemplo, na interação rizóbio-leguminosa (Lynn & Chang,

1990; Hirsch, 1992; Bécard, 2004). São comumente encontrados em exsudatos radiculares ou em sementes de plantas (Maxwell et al., 1989; Nair et al., 1991; Tsai & Phillips, 1991).

Flavonóides encontram-se em altas concentrações em raízes ou em exsudatos radiculares de plantas sujeitas a baixos níveis de fósforo disponível (Nair et al., 1991; Akiyama et al., 2002). Em concentrações micromolares, estimulam o crescimento de fungos micorrízicos arbusculares *in vitro* (Graham, 1982; Douds et al., 1999; Tawaraya et al., 1996; Nagahashi, 2000) e a colonização micorrízica (Siqueira et al., 1991; Xie et al., 1995), sendo observadas modificações na composição de flavonóides nos exsudatos de raízes micorrizadas (Harrison and Dixon, 1993; Larose et al., 2002). Outras isoflavonas, flavonas e flavononas têm efeito similar (Gianinazzi-Pearson et al., 1989; Tsai & Phillips, 1991; Nair et al., 1991). Apesar dessas evidências, mutantes de milho deficientes na atividade de chalcona sintase não produzem flavonóides, mas são colonizados normalmente por vários fungos micorrízicos arbusculares (Bécard et al., 1995 citado por Bécard et al., 2004). Isso sugere que os flavonóides não são indispensáveis para o estabelecimento da simbiose micorrízica arbuscular (Douds Jr. & Nagahashi, 1996; Bécard et al., 2004). Possivelmente, esses compostos contribuem para a colonização micorrízica estimulando o crescimento das hifas e, conseqüentemente, o contato fungo-raiz, essencial durante a fase de pré-infecção (Nair et al., 1991; Douds. & Nagahashi, 1996; Bécard et al., 2004).

Os compostos flavonóides exsudados de raízes de leguminosas estimulam a germinação de esporos de fungos fitopatogênicos (Bagga & Straney, 2000). Os macroconídios de *Nectria haematococca*, patógeno da ervilha, *Pisum sativum* L., germinam em resposta aos mesmos flavonóides que induzem a expressão de genes *nod* em rizóbios específicos dessa planta. A conservação dessas respostas nesses dois tipos de interações sugere a existência de vias comuns de transdução de sinal.

A natureza impermeável e hidrofóbica da parede celular de *Pisolithus* sp. (Costa, 2002; Campos & Costa, 2010a), bem como a quantidade e qualidade dos compostos de reserva (Campos et al., 2008; Campos & Costa, 2010b) e a presença de compostos inibitórios (Pereira, 2004) representam os principais fatores que influenciam negativamente a germinação dos basidiósporos de *Pisolithus* sp e a introdução de fungos ectomicorrízicos em viveiros florestais, uma vez que o uso de micélio vegetativo ou de esporos são alternativas comumente aventadas na literatura para este propósito.

A eliminação das barreiras de permeabilidade na parede celular dos basidiósporos de *P. microcarpus* tem sido realizada por métodos de permeabilização, a exemplo do tratamento com enzimas líticas, ácidos fortes e hipoclorito de sódio (Costa, 2002; Godinho, 2011). A permeabilização da parede celular utilizando hipoclorito de sódio é a mais eficaz, resultando em mais de 90 % dos basidiósporos permeabilizados, a depender da concentração e do tempo de exposição ao composto (Godinho, 2011). O tratamento com hipoclorito de sódio a 2,5 %, por 40 segundos, foi capaz de promover a permeabilização de 83 % dos basidiósporos de *P. microcarpus*, sem perda de viabilidade e sem causar alterações morfológicas visíveis (Godinho, 2011). No entanto, não foi avaliada a reprodutibilidade deste tratamento em função da variação morfo-fisiológica dos basidiocarpos e os efeitos dessa escarificação química sobre a hidrofobicidade e germinação dos basidiósporos *in vitro* ou *in vivo*.

A permeabilização da parede celular dos basidiósporos de *P. microcarpus* e a análise de suas conseqüências para a morfologia, hidrofobicidade e viabilidade dos basidiósporos poderá contribuir de forma significativa para o avanço da pesquisa da simbiose ectomicorrízica e na aplicação de *Pisolithus* sp. no setor florestal brasileiro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Micro-organismo e condições de armazenamento

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Associações Micorrízicas do Departamento de Microbiologia, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG. Basidiocarpos de *P. microcarpus* foram coletados sob florestas de *Eucalyptus* sp. no Setor de Silvicultura da UFV, no período de agosto de 2012 a junho de 2013. Os basidiocarpos foram lavados externamente com água desionizada e imersos em etanol 70 % por 1 min, para desinfestação superficial, e secos ao ar em capela de fluxo laminar. Os basidiocarpos foram seccionados longitudinalmente com bisturi e os esporos, coletados com espátula esterilizada, foram mantidos em geladeira.

3.2. Permeabilização de basidiósporos de *P. microcarpus* utilizando-se diferentes marcas de água sanitária

Foram testadas cinco marcas de água sanitária disponíveis no mercado local, contendo de 2 a 2,5 % de cloro ativo (p/p), para a permeabilização dos basidiósporos. As concentrações de água sanitária utilizadas foram 15 e 50 % por 40s, condições testadas anteriormente que causaram a permeabilização da parede celular dos basidiósporos. Para a permeabilização da parede celular dos basidiósporos de *P. microcarpus*, 0,5 g de esporos foram suspensos em 1 mL de solução Tween 80 a 0,5 %. A suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm por 8 min e lavada três vezes com água. Finalmente, os basidiósporos foram resuspensos em água e submetidos ao tratamento

de escarificação com água sanitária (Costa, 2002). Alíquotas de 250 µL da suspensão de basidiósporos foram transferidas para tubos Eppendorf de 1,5 mL e tratadas com 250 µL de água sanitária, de forma a se obter as concentrações finais de 15 e 50 % de água sanitária. O tratamento foi interrompido pela adição de 500 µL de tiosulfato de sódio a 0,14 mol L⁻¹. Os basidiósporos foram centrifugados a 10.000 rpm por 2 min, lavados duas vezes em água destilada e corados com 250 µL do corante Negro Sudão B a 2 % (p/v). Para determinar a porcentagem de basidiósporos permeabilizados, uma alíquota de 10 µL de cada suspensão de esporos corados foi montada entre lâmina e lamínula e observada em microscópio de luz, sendo contados cinco campos de cada lâmina. Consideraram-se como permeabilizados os basidiósporos corados com Negro Sudão B. O experimento foi montado com três repetições e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

3.3. Permeabilização de basidiósporos oriundos de diferentes basidiocarpos

Dez basidiocarpos de *P. microcarpus* foram coletados aleatoriamente ao longo de estrada vicinal que conecta a rodovia MG 280 (20°47'52.06''S, 42°52'40.86''O) ao Distrito de Monte Celeste (20°54'00.00''S, 42°53'00.00''O), Município de São Geraldo, MG. Após a amostragem e limpeza superficial dos basidiocarpos com água desionizada, os basidiósporos foram coletados e submetidos aos procedimentos de permeabilização nas concentrações de 15 e 50 % de água sanitária durante 40 s, coloração com Negro Sudão B a 2 % (v/v) e determinação da porcentagem de permeabilização, conforme descrito no item 3.2. O experimento foi montado com três repetições e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância. As médias de cada tratamento foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

3.4. Análise da hidrofobicidade de basidiósporos

A análise da hidrofobicidade dos basidiósporos antes e após o tratamento de permeabilização foi baseada no método BATH (Adherence of bacteria to hydrocarbons), conforme descrito por Rosenberg et al (1980), com modificações (Singh et al., 2004). Os basidiósporos oriundos de dez basidiocarpos (item 3.3) foram permeabilizados com água sanitária a 15 ou 50 % por 40 s. Amostras de 100 µl das

suspensões de basidiósporos permeabilizados ou não, contendo 5×10^6 esporos por mL, foram misturadas com 6,8 mL de PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2. A essa mistura foram adicionados 3,2 mL de tolueno (E Merck India Ltd) em tubos de ensaio previamente lavados com ácido muriático a 2 %. A mistura foi agitada por 1 min e deixada em descanso por 15 min para permitir a separação de fases. Uma alíquota de 100 μl da fase aquosa foi retirada para contagem de basidiósporos em câmara de Neubauer. A hidrofobicidade foi avaliada pela porcentagem dos basidiósporos que permaneceram na fase aquosa (Gottlich et al., 1995) depois da adição de tolueno. O experimento foi montado com três repetições e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

3.5. Otimização das condições de permeabilização da parede celular de basidiósporos de *P. microcarpus*

A otimização das condições de permeabilização foi feita para um dos basidiocarpos coletados, seguindo-se os procedimentos descritos no item 3.2. As concentrações finais de água sanitária testadas foram 0; 2,5; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45 e 50 % (v/v). Os tempos de exposição ao agente de permeabilização foram 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 s. O experimento foi montado com três repetições e os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão.

3.6. Microscopia eletrônica de varredura de basidiósporos permeabilizados

Basidiósporos oriundos de 1 basidiocarpo foram permeabilizados ou não com água sanitária a 15 e 50 % por 40 s e fixados em formalina 10 % (v/v) por 2 h, sendo posteriormente submetidos à secagem em estufa a 40 °C, por 24 h. Os basidiósporos foram metalizados com camada de ouro com espessura de 150 Å e observados em microscópio eletrônico de varredura modelo LEO VP1430 no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

3.7. Microscopia eletrônica de transmissão de basidiósporos permeabilizados

Basidiósporos oriundos de 1 basidiocarpo foram permeabilizados ou não com água sanitária a 15 e 50 % por 40 s. O exame da ultraestrutura da parede celular de *P. microcarpus* seguiu o procedimento descrito por Mims e Thurston (1979) e Webster (2007) modificado pelo processamento com 5 pulsos de choque térmico por 40 s em micro-ondas potência e 5 min em geladeira, após cada etapa a seguir: basidiósporos permeabilizados ou não foram fixados em solução de glutaraldeído a 2,5 % e em cacodilato de sódio 0,2 M, pH 7,2, por 4 h à temperatura ambiente, sendo posteriormente ressuspensos em cacodilato de sódio a 0,1 mol L⁻¹ por 5 min (2X). A suspensão foi centrifugada e ressuspensa em OsO₄ a 1 % por 2 h à temperatura ambiente. Após esse período, a solução foi ressuspensa em 500 µL de cacodilato de sódio a 0,1 mol L⁻¹, centrifugada e, posteriormente, mantida em álcool 70 % por 24 h sob refrigeração. Os basidiósporos foram desidratados por meio de séries graduadas de 20 min em etanol 80, 90, 95 e 100 %. As amostras desidratadas foram incluídas em resina LR White e submetidas à microtomia. As seções foram contrastadas com acetato de uranila a 1% e citrato de chumbo e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM109 no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

3.8. Viabilidade de basidiósporos permeabilizados

Basidiósporos oriundos de um basidiocarpo selecionado foram permeabilizados pela exposição à água sanitária a 5, 10, 15, 30 e 50 % por 40 s. Para a verificação da viabilidade, os basidiósporos foram corados com o Kit Live/Dead Fungal Light Yeast Viability, Molecular Probes®, Life Technologies™, conforme instruções do fabricante. O corante verde fluorescente SYTO Green (excitação/emissão 480/500 nm) e iodeto de propídio (excitação/emissão 490/635 nm) diferem em sua capacidade de penetrar na célula. Quando utilizado sozinho, SYTO Green marca geralmente todas as células: com membrana intacta e danificada. Ao contrário, iodeto de propídio penetra apenas nas células com membranas danificadas, causando redução no SYTO Green quando ambos estão presentes. Células com membrana intacta emitem fluorescência verde, enquanto células com membrana danificada emitem fluorescência vermelha. As amostras foram analisadas em microscópio de fluorescência Olympus BX 50 com acessórios para epifluorescência Y-F e as imagens capturadas com câmera digital Olympus PM –

C35DX. O experimento foi montado com três repetições e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

3.9. Germinação *in vitro* de basidiósporos de *P. microcarpus*

Basidiósporos oriundos de um basidiocarpo recém-coletado foram permeabilizados conforme descrito no item 3.2 pelo tratamento com água sanitária na concentração de 10 % por 40 s. O tempo de 40 s foi aquele que permitiu a eliminação de micro-organismos contaminantes e a manutenção da maior porcentagem de basidiósporos viáveis, 35 %, (dados não mostrados). Alíquotas de 100 μL de uma suspensão contendo $5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ de esporos permeabilizados foram espalhadas em vinte placas de Petri contendo 25 mL de meio Melin-Norkans modificado (Marx, 1969), suplementado com 2 g L^{-1} de carvão ativado, de forma a se obter uma densidade final de $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ de esporos por placa.

Uma plântula de *E. citriodora*, com uma semana de idade e isenta de contaminação, foi colocada na região mediana da placa contendo os esporos. A obtenção de plântulas de *E. citriodora* livres de contaminação foi feita segundo os procedimentos de Pereira (2004): as sementes foram desinfestadas superficialmente por imersão em etanol a 70 % por um minuto, seguido de tratamento com H_2O_2 a 30 % por 6 min e cinco lavagens em água destilada esterilizada. Após a desinfestação, as sementes foram germinadas em placas de Petri contendo papel filtro esterilizado, umedecido com água destilada esterilizada, e mantidas a 25 °C e com 16 h de luz ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

As placas foram seladas com filme de PVC e incubadas em câmara de crescimento à temperatura de 25 °C e com 16 h de luz ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Para determinar a porcentagem de germinação dos basidiósporos, o surgimento de colônias foi avaliado de 2 em 2 dias pela observação direta das placas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Permeabilização de basidiósporos utilizando-se diferentes marcas de água sanitária

As marcas de água sanitária testadas diferiram quanto à eficiência em permeabilizar a parede celular dos basidiósporos de *P. microcarpus* (Figura 1). Nas concentrações de 15 e 50 % de água sanitária por 40s, a marca 1 permeabilizou, respectivamente, 12 e 78 % dos basidiósporos tratados. Dado a sua maior eficiência de permeabilização, essa marca foi a escolhida para ser utilizada em todos os demais experimentos realizados neste trabalho. A marca 2, nas concentrações de 15 e 50 %, por tempo de exposição de 40 s, permeabilizou, respectivamente, 7 e 53 % dos basidiósporos.

As diferenças de permeabilização encontradas para cada marca de água sanitária podem estar relacionadas à composição química. O teor de cloro ativo, descrito nas embalagens das 5 marcas testadas, está de acordo com o exigido pela legislação, entre 2,0 a 2,5 % (p/p) (Inmetro, 2013). A marca 1 apresenta hidróxido de sódio e carbonato de sódio como componentes adicionais ao hipoclorito de sódio e à água, enquanto as marcas 2, 3, 4 e 5 eram constituídas apenas de hipoclorito de sódio e água. O hidróxido de sódio e o carbonato de sódio, assim como o hipoclorito de sódio, possuem ação antimicrobiana relatadas na literatura (Siqueira Jr & Lopes, 1999; Adner & Zetterlund, 2002; Silhacek & Taake, 2005; Estrela et al., 2006).

O mecanismo de ação proposto ao hipoclorito de sódio como antimicrobiano está relacionado à sua característica de agente oxidante de enzimas, provocando distúrbios de funções metabólicas na célula microbiana (Rutala & Weber, 1997; Estrela

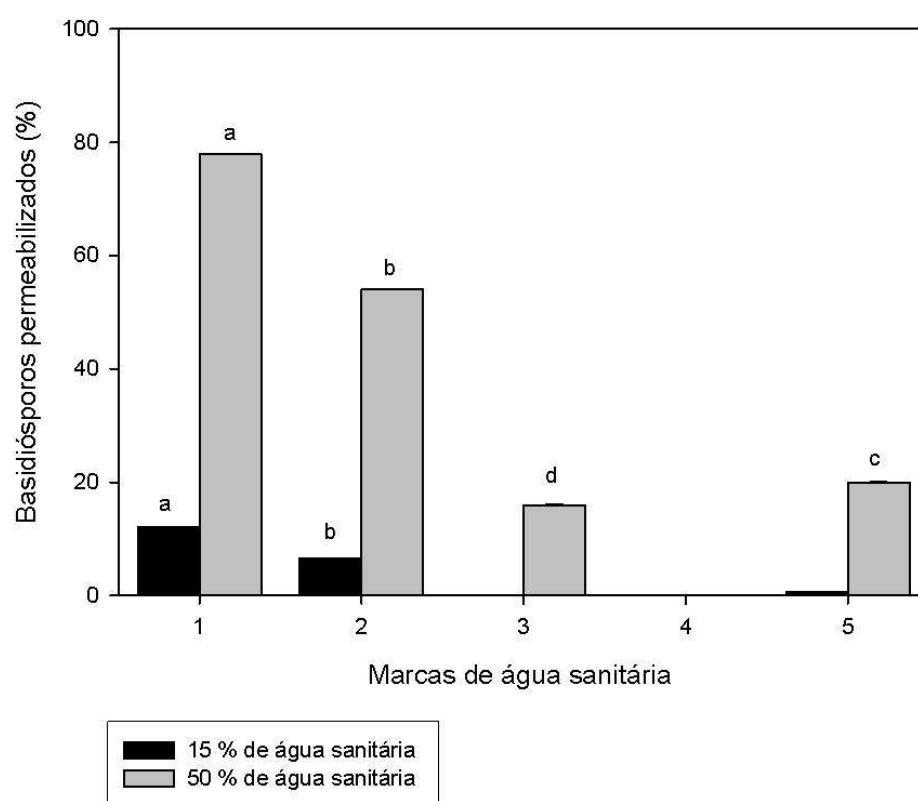


Figura 1. Porcentagem de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* permeabilizados pelo tratamento com diferentes marcas de água sanitária. Para cada concentração, médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

et al., 2002; Valera et al., 2009), dissolvendo matéria orgânica e desnaturando proteínas (Zehnder, 2006). A presença do hidróxido de sódio e outros sais maximiza a estabilidade do hipoclorito de sódio (Rutala & Weber, 1997). A ação sinérgica desses compostos com o cloro ativo do hipoclorito de sódio pode justificar a maior eficiência de permeabilização promovida pela marca 1.

Observou-se, ainda, a necessidade de se utilizar produto recém aberto, haja vista a rápida perda de eficiência de permeabilização após a abertura das embalagens contendo o hipoclorito de sódio (dados não mostrados). Assim, a variação na eficiência dos produtos comerciais em permeabilizar a parede celular dos basidiósporos pode estar relacionada com a vida de prateleira, tipo, fechamento e variações na concentração de hipoclorito de sódio presentes nas embalagens.

4.2. Permeabilização de basidiósporos oriundos de diferentes basidiocarpos

A variação na susceptibilidade dos basidiósporos oriundos de diferentes basidiocarpos ao tratamento de permeabilização com água sanitária foi evidenciada neste trabalho (Figura 2). No tratamento com 15 % de água sanitária e tempo de 40 s, a porcentagem de basidiósporos permeabilizados variou de 4,5 a 26 %, a depender do basidiocarpo. No tratamento com 50 % de água sanitária, pelo mesmo tempo de exposição, os valores variaram de 70 a 95 %.

O período de coleta dos basidiocarpos, as condições físico-químicas do ambiente, bem como a fase de maturação dos basidiósporos (Campos & Costa, 2010a), podem influenciar a susceptibilidade desses propágulos ao tratamento de permeabilização com água sanitária. O estágio de maturação dos basidiósporos parece ser determinante, uma vez que à medida que amadurecem, ocorre a deposição de diferentes camadas de parede celular, tornando-os mais resistentes e impermeáveis (Mims, 1980; Martin et al., 1999; Campos & Costa, 2010a).

Os basidiósporos coletados devem representar propágulos em diferentes estádios de desenvolvimento em razão da estrutura dos basidiocarpos, que não assegura a coleta de material em uma única fase. Este fato é evidenciado pelos dados de Campos & Costa (2010a) que observaram que, mesmo em um único peridíolo, o desenvolvimento dos basidiósporos pode ser assíncrono. Os resultados obtidos no presente trabalho indicam

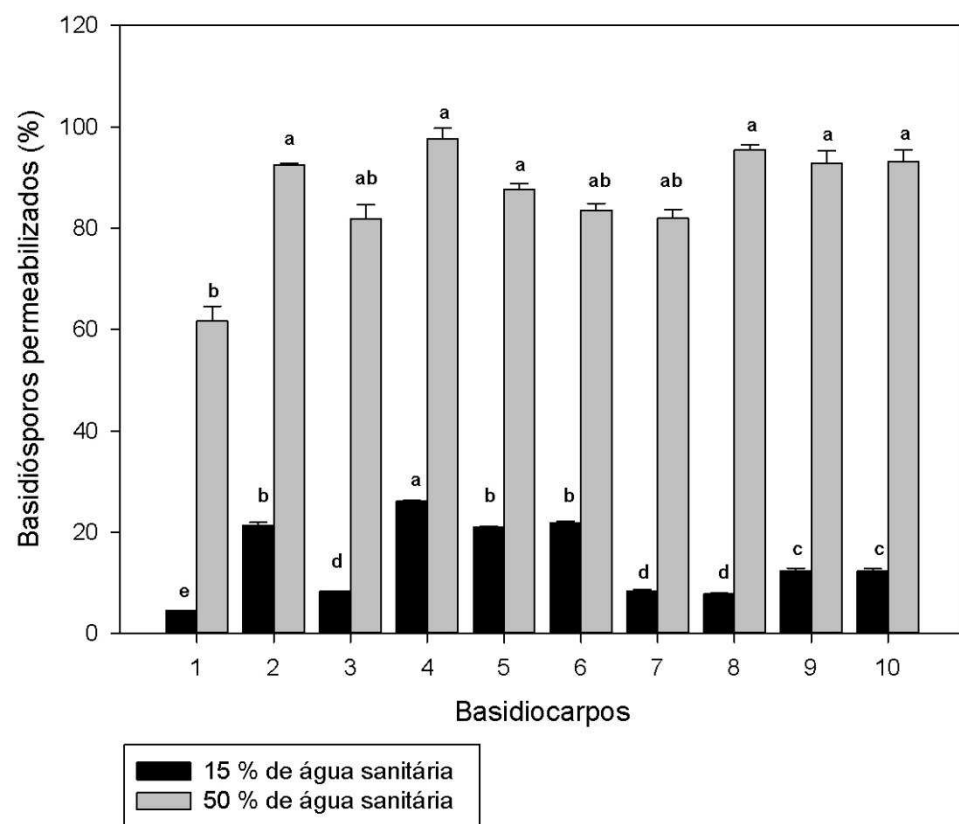


Figura 2. Porcentagem de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* oriundos de 10 basidiocarpos, permeabilizados com água sanitária nas concentrações de 15 e 50 % por 40s. Para cada concentração de água sanitária, médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

a necessidade de padronização do tratamento de permeabilização para cada basidiocarpo coletado.

4.3. Hidrofobicidade de basidiósporos após a permeabilização

O tratamento de permeabilização reduziu a hidrofobicidade dos basidiósporos (Figura 3). Essa redução supostamente ocorreu em razão da eliminação de compostos hidrofóbicos presentes na parede celular dos basidiósporos. A presença de compostos hidrofóbicos na parede dos basidiósporos de *P. microcarpus* é bastante conhecida, dificultando a produção de suspensões de esporos e, possivelmente, a entrada de compostos estimuladores da germinação (Costa, 2002; Pereira, 2004). A presença de hidrofobinas nas hifas e ectomicorrizas de *Pisolithus* já foi relatada (Martin et al., 1997; Tagu et al, 2000).

4.4. Otimização das condições de permeabilização da parede celular de basidiósporos de *P. microcarpus*

A porcentagem de basidiósporos de *P. microcarpus* permeabilizados com água sanitária foi proporcional ao aumento na concentração e tempo de exposição ao agente permeabilizante (Figura 4). A partir da concentração de 5 % com 80 s de exposição à água sanitária, os basidiósporos tiveram a parede celular permeabilizada, fato constatado pela entrada do corante Negro Sudão B. O maior percentual de permeabilização (88 %) foi obtido com a combinação da concentração de 50 % de água sanitária com o tempo de 80 s (Anexo 1).

As porcentagens de basidiósporos com a parede celular permeabilizada relatadas neste estudo diferiram daquelas encontradas por Godinho (2011), que relatou porcentagens de basidiósporos permeabilizados que variaram de 51 a 97 % em função da concentração e do tempo de exposição ao hipoclorito de sódio. Além disso, no trabalho de Godinho (2011), os basidiósporos maduros foram permeabilizados a partir da concentração equivalente a 2,5 % de água sanitária, com um tempo de contato de 10 s, fato não observado no presente trabalho (Figura 4). A diferença nas porcentagens de permeabilização pode resultar da variação morfo-fisiológica existente entre diferentes basidiocarpos, coletados em diferentes locais e épocas.

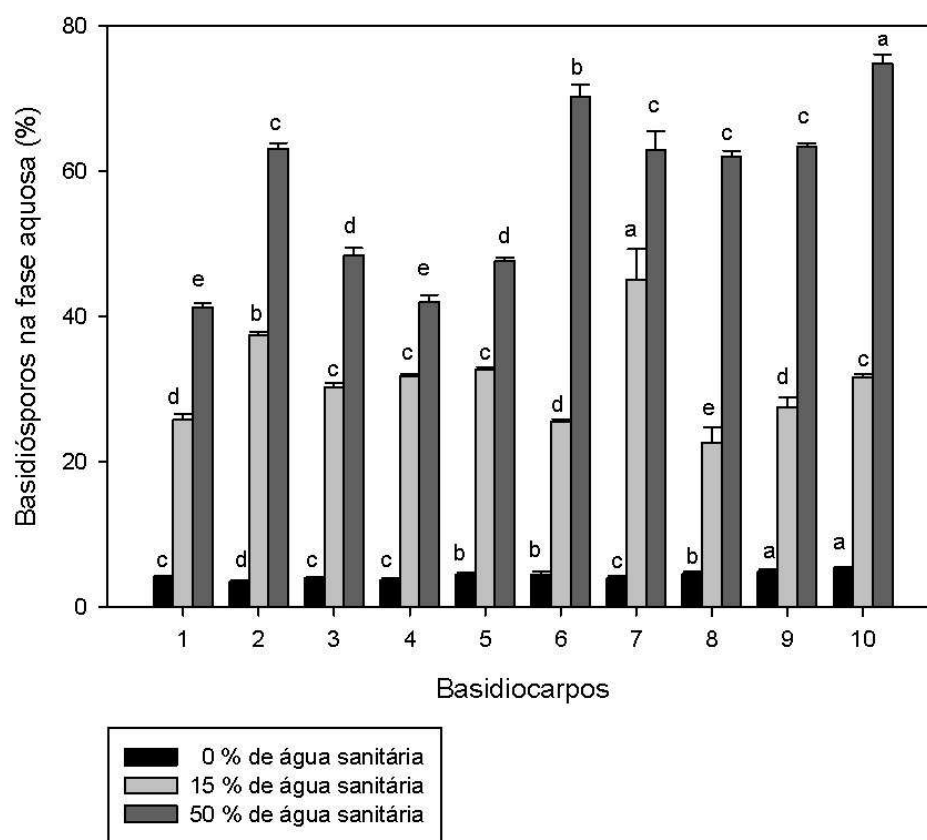


Figura 3. Porcentagem de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* presentes na fase aquosa após permeabilização da parede celular com água sanitária nas concentrações 15 e 50 % por 40 s. Basidiocarpos numerados de 1 a 10. Para cada concentração de água sanitária, médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

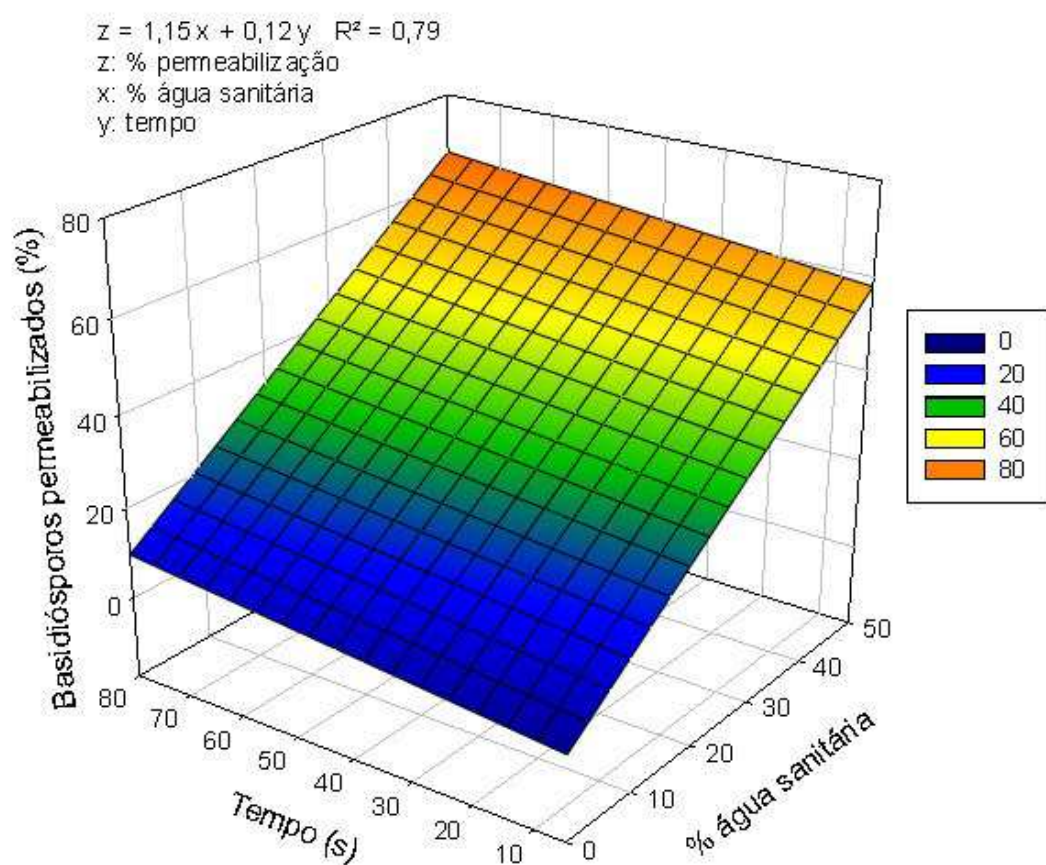


Figura 4. Porcentagem de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* permeabilizados com água sanitária em diferentes concentrações e tempos de exposição. A concentração de cloro ativo original do produto comercial utilizado foi de 2 a 2,5% (p/p).

4.5. Ultramorfologia da parede celular de basidiósporos após a permeabilização

Foram observadas alterações na ornamentação das espículas contidas na última camada da parede celular dos basidiósporos permeabilizados (Figura 5). Tais alterações foram mais drásticas na maior concentração de água sanitária utilizada, 50 %, com tempo de exposição de 40 s, condição em que se observou a perda parcial ou total das espículas (Figura 5).

Os dados obtidos nesse trabalho são semelhantes aos encontrados por Godinho (2011). Possivelmente, as alterações da parede celular podem estar associadas a perdas de viabilidade dos basidiósporos, haja vista a importância dessa estrutura para o desempenho de funções vitais para a fisiologia do fungo, a exemplo da proteção contra mudanças nas condições de osmolaridade do meio e na sinalização celular (Albertsheim e Prouty, 1975; Schoffelman et al., 1999; Bowman e Free, 2006), aderência a substratos, interação com hospedeiros, compatibilidade vegetativa, reprodução, dispersão e sobrevivência (Schoffelman et al., 1999).

A análise da ultraestrutura dos basidiósporos de *P. microcarpus* por meio de microscopia eletrônica de transmissão revelou os seguintes aspectos da parede celular deste fungo (Figura 6 e 7): os basidiósporos maduros possuem parede celular constituída de quatro camadas, sendo a mais externa, L₁, elétron-densa e ornamentada de espículas em sua superfície, seguida de uma camada interna elétron-transparente, L₂. A terceira camada, L₃, também é elétron-densa e, a camada mais interna, L₄, é elétron-transparente. Este é o primeiro relato da conformação estrutural da parede celular de basidiósporos de *P. microcarpus*. Estruturalmente, a parede celular dessa espécie fúngica é semelhante à de *P. tinctorius* (Mims, 1980).

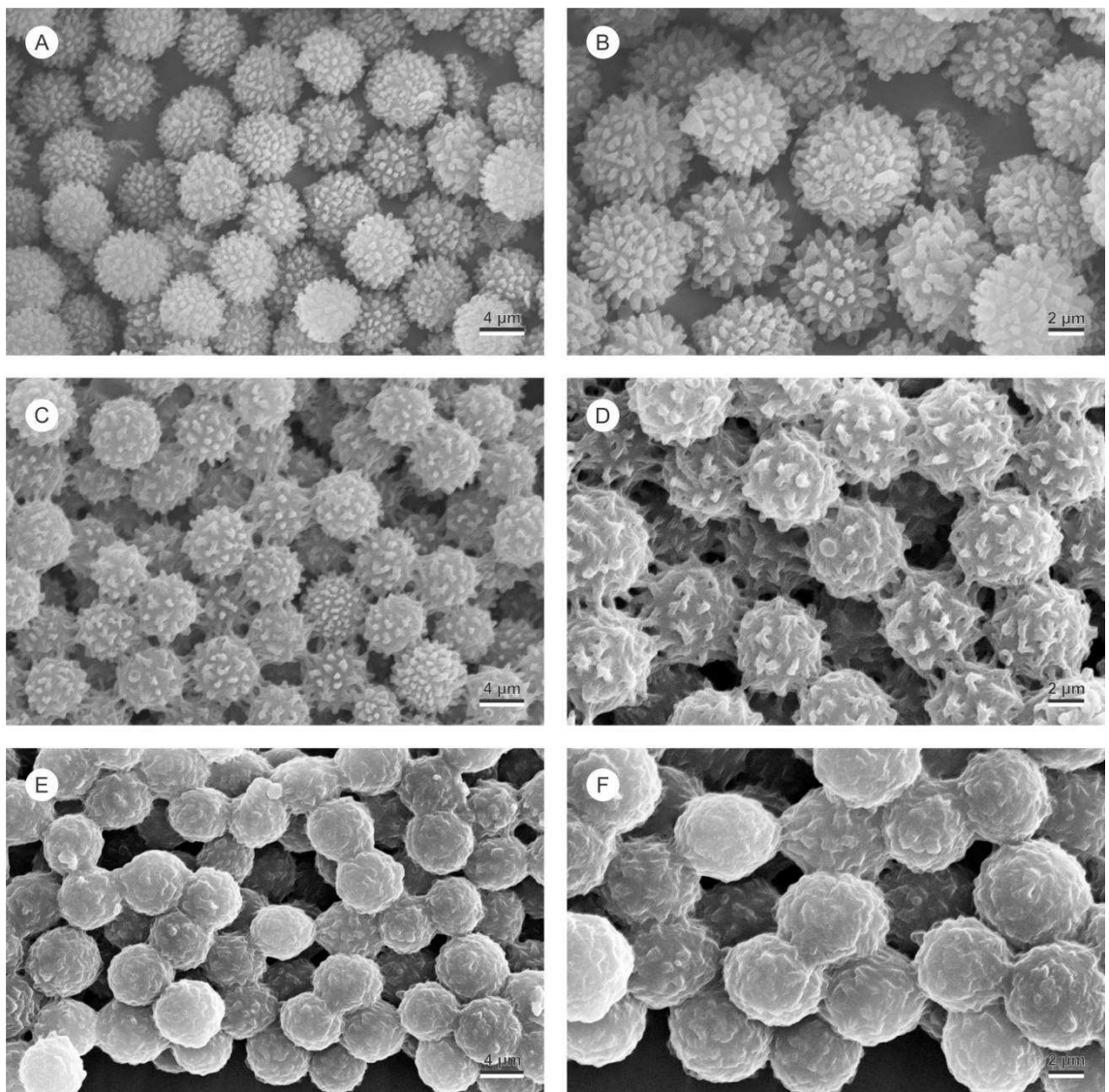


Figura 5. Micrografia eletrônica de varredura de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* intactos ou permeabilizados com soluções de água sanitária. (A e B) Basidiósporos do tratamento controle, não-permeabilizados. Notar a ornamentação da superfície do basidiósporo com espículas. (C e D) Basidiósporos permeabilizados com água sanitária a 15 % por 40 s. Notar a presença de espículas com morfologia alterada. (E e F) Basidiósporos permeabilizados com água sanitária a 50 % por 40 s. Notar o desaparecimento parcial ou total das espículas, com alterações na morfologia dos basidiósporos.

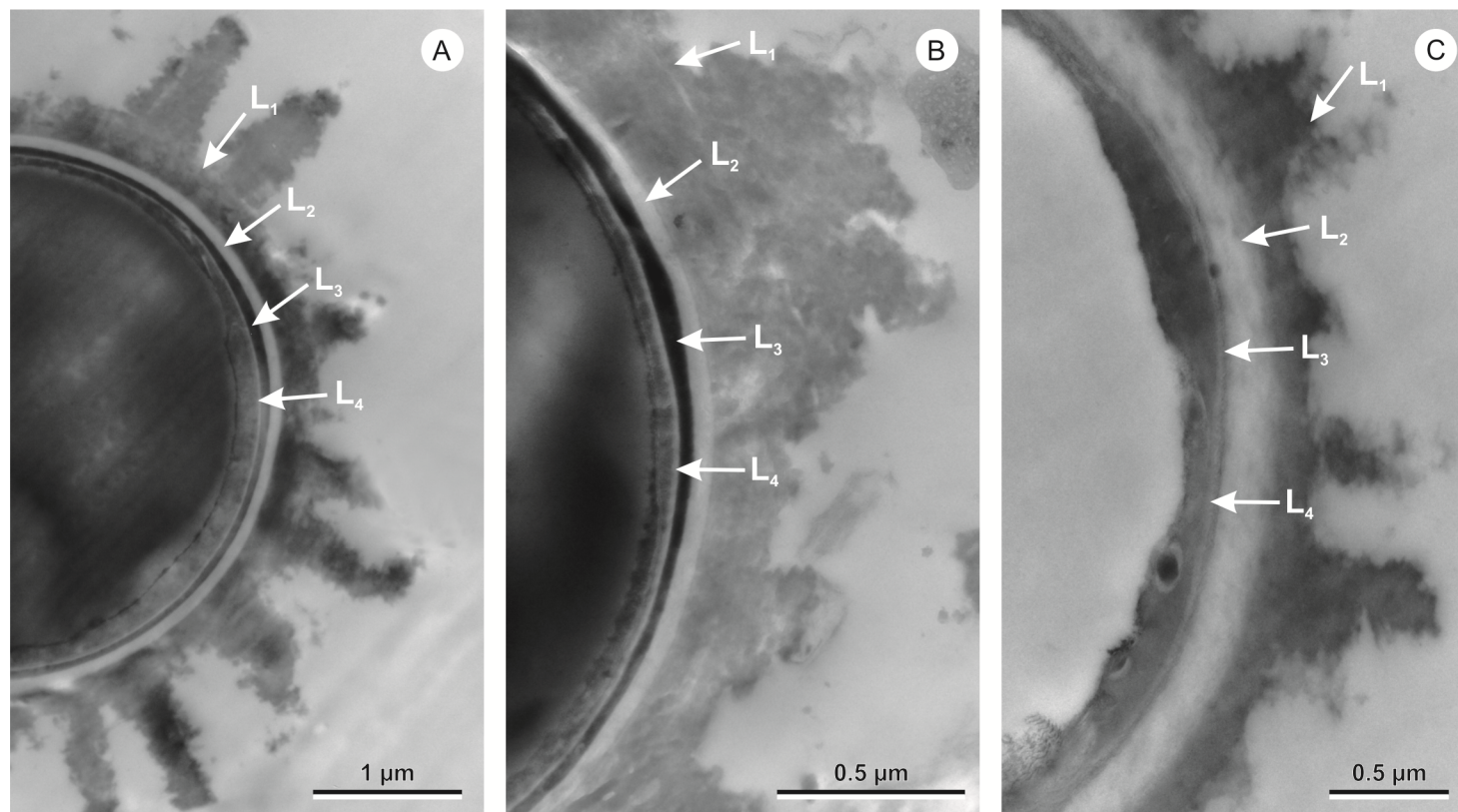


Figura 6. Ultraestrutura da parede celular de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* intactos ou permeabilizados com água sanitária. Ampliação ilustrando a parede celular de basidiósporos maduros estratificada em 4 camadas (L₁, L₂, L₃ e L₄) e a presença de espículas na superfície. (A) Basidiósporo do tratamento controle, não-permeabilizados. Notar a presença de espículas intactas. (B) Basidiósporo permeabilizado com água sanitária a 15 % por 40 s. Observar a presença de espículas parcialmente degradadas. (C) Basidiósporo permeabilizado com água sanitária a 50 % por 40 s. parcialmente degradadas.

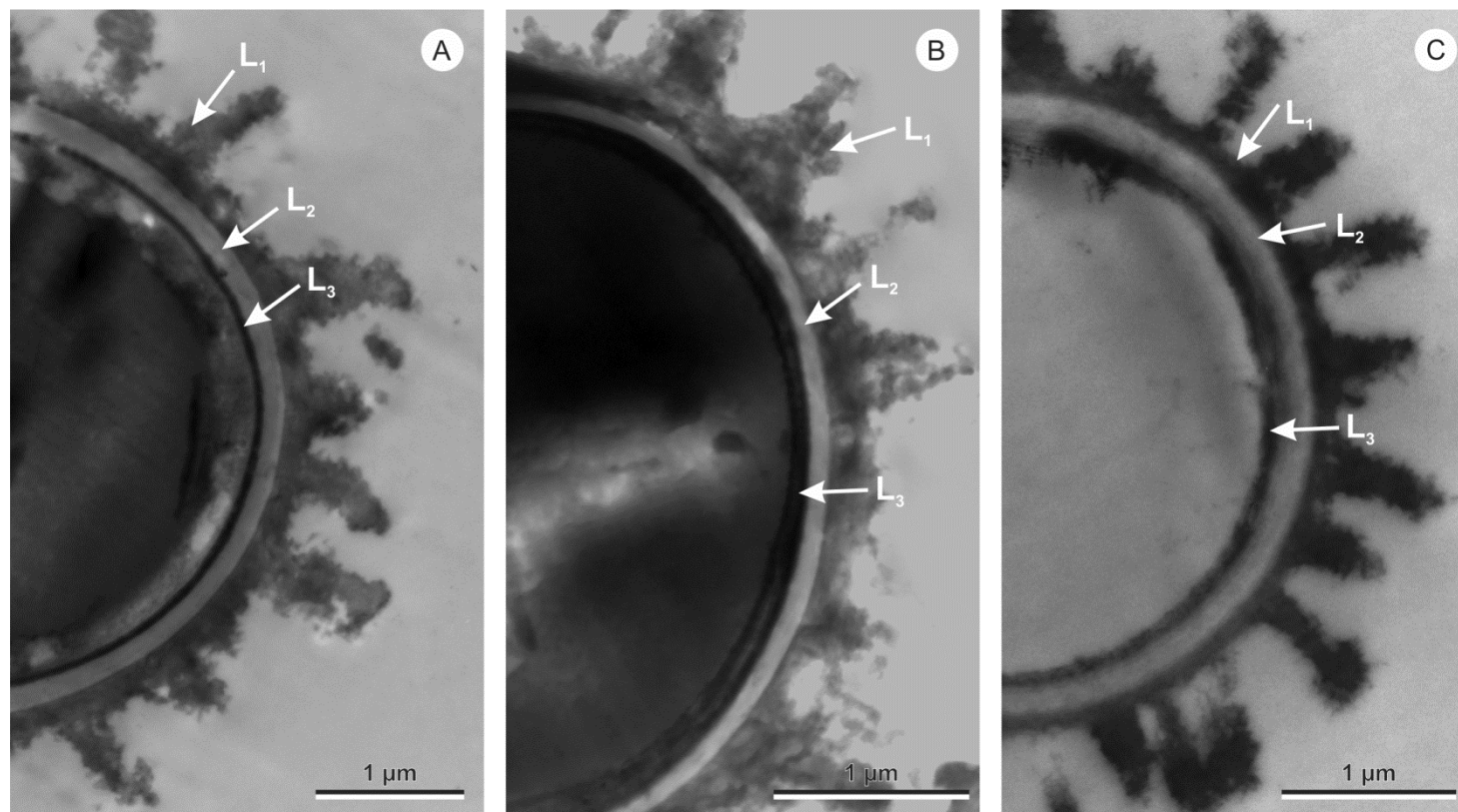


Figura 7. Ultraestrutura da parede celular de basidiósporos de *P. microcarpus* intactos ou permeabilizados com água sanitária. Ampliação ilustrando a parede celular de basidiósporos não maduros estratificada em 3 camadas (L₁, L₂ e L₃). (A) Basidiósporo do tratamento controle, sem permeabilização. (B) Basidiósporos permeabilizados com água sanitária a 15 % por 40 s. (C) Basidiósporos permeabilizados com água sanitária a 50 % por 40 s.

A partir de um mesmo basidiocarpo, foram coletados basidiósporos em diferentes estádios de maturação, fato evidenciado pela presença de três ou quatro camadas de parede celular nesses propágulos (Figura 6 e 7).

A preparação dos basidiósporos de *P. microcarpus* para exame por microscopia eletrônica de transmissão foi difícil. A combinação das metodologias utilizadas por Mims e Thurston (1979) e Webster (2007) com processamento em micro-ondas permitiu o preparo e a observação dos basidiósporos não-permeabilizados (Figuras 6 A e 7A), ainda que com dificuldade. No processo de basidiosporogênese, a camada mais externa de parede celular desenvolve-se primeiramente e as demais camadas progridem conforme o esporo amadurece (Mims, 1980; Campos & Costa, 2010a). À medida que as camadas da parede celular são depositadas, os basidiósporos de *P. tinctorius* tornam-se cada vez mais difíceis de serem preparados para a análise de microscopia eletrônica de transmissão (Mims, 1980), em razão da redução da permeabilidade da parede. Da mesma forma, os basidiósporos maduros de *P. microcarpus* são impermeáveis a corantes, dificultando a observação de núcleos ou materiais de reserva por microscopia de luz ou de fluorescência (Costa, 2002; Campos & Costa, 2010 a e b; Godinho, 2011). Esse problema tem sido contornado por meio da técnica de permeabilização.

4.6. Viabilidade de basidiósporos permeabilizados

A viabilidade dos basidiósporos foi reduzida com o aumento da concentração de água sanitária utilizada no procedimento de permeabilização (Figuras 8 e 9). A utilização de água sanitária nas concentrações de 5, 10, 15, 30 e 50 % por 40 s resultou em, respectivamente, 80, 35, 19 e 2 % de basidiósporos viáveis. Nos tratamentos em que foram utilizadas baixas concentrações de água sanitária, os basidiósporos apresentaram parede celular permeabilizada e integridade da membrana (Figura 8 e 9B). No tratamento com água sanitária a 50 % por 40 s, nenhum basidiósporo permaneceu viável (Figura 8 e 9C).

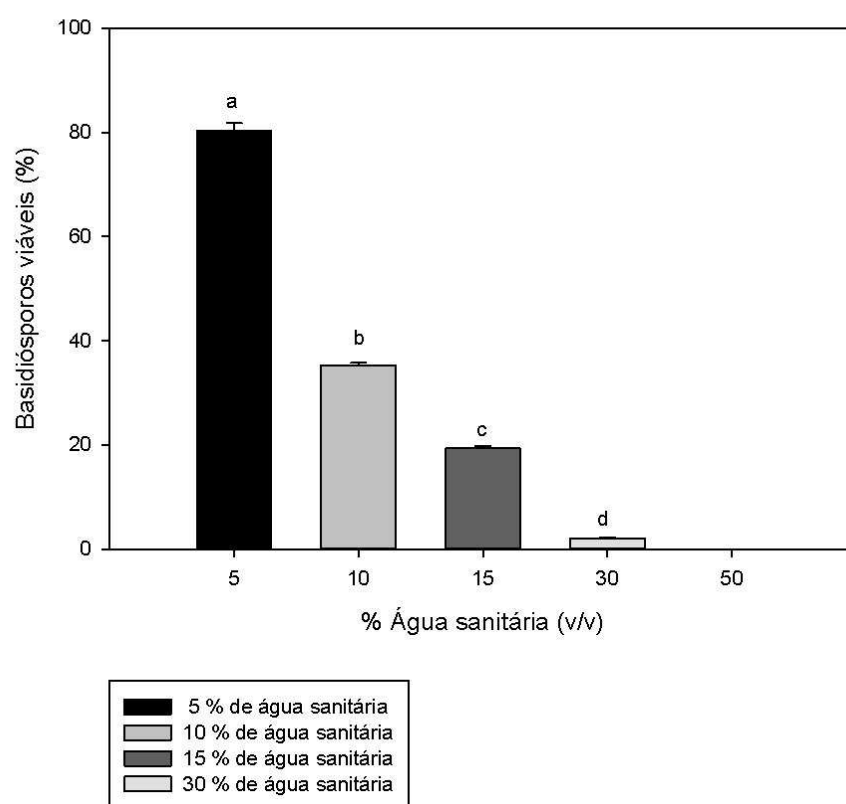


Figura 8. Porcentagem de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* viáveis após a permeabilização da parede celular com água sanitária nas concentrações 5, 10, 15, 30 e 50 % por 40 s. Para cada concentração de água sanitária, médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

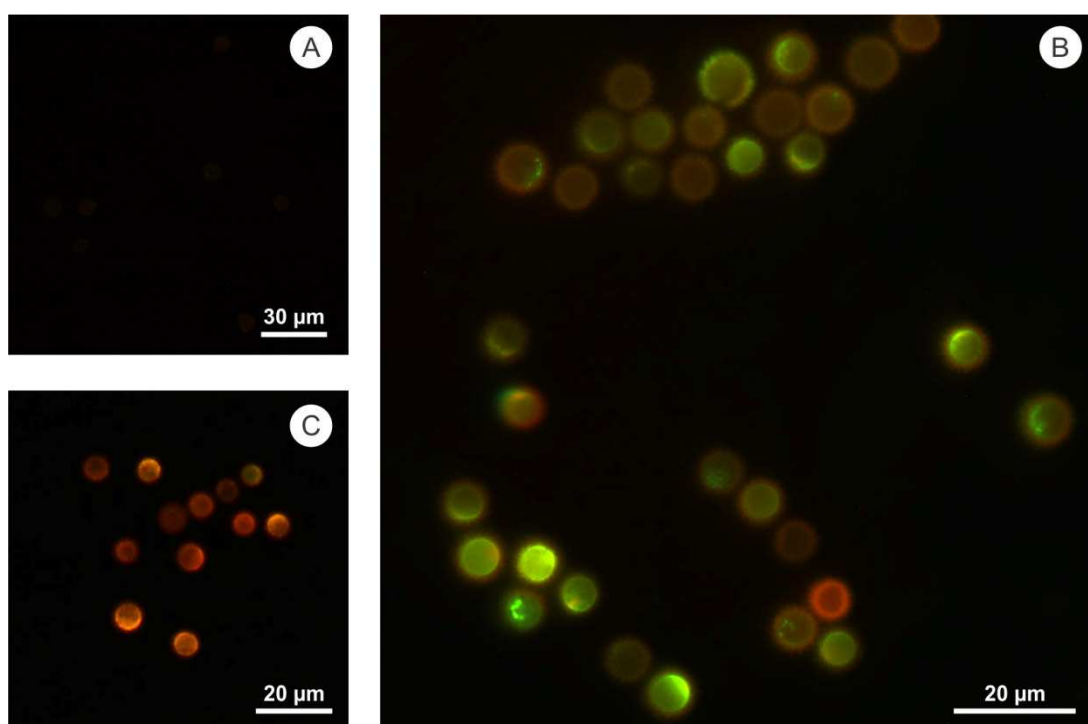


Figura 9. Basidiósporos de *Pisolithus microcarpus* intactos ou permeabilizados com água sanitária e corados com Kit Live/Dead Fungal Light Yeast Viability, Molecular Probes[®], Life Technologies[™], observados por microscopia de fluorescência. (A) Basidiósporos não-permeabilizados. Não ocorreu emissão de fluorescência. (B) Basidiósporos permeabilizados a 10 % por 40 s. Notar fluorescência verde emitida por basidiósporos viáveis e a vermelha, por aqueles com membrana celular danificada. (C) Basidiósporos permeabilizados a 50 % por 40 s. Notar fluorescência vermelha emitida por basidiósporos inviáveis.

Nos basidiósporos não-permeabilizados (controle), não foi observada qualquer emissão de fluorescência, ressaltando a necessidade da escarificação química da parede celular para a entrada de corantes no interior da célula (Figura 9 A). Esses dados diferem dos de Godinho (2011), que obteve o máximo de viabilidade (80 %) com água sanitária a concentração equivalente a 2,5 % por 40 s. Os resultados obtidos evidenciam a necessidade de padronização do procedimento de permeabilização para cada basidiocarpo a ser utilizado experimentalmente.

4.7. Germinação de basidiósporos permeabilizados

Foi possível obter colônias fúngicas a partir da germinação dos basidiósporos permeabilizados com água sanitária a 10 % por 40 s (Figura 10A e B). Esse tratamento foi também eficaz para se eliminar contaminantes microbianos que são naturalmente encontrados nos basidiocarpos. As primeiras colônias de *P. microcarpus* oriundas dos basidiósporos com parede celular permeabilizada apareceram entre o 15^o e o 18^o dia de incubação dos basidiósporos na presença da planta hospedeira *E. citriodora*. Em trabalhos prévios sobre a germinação *in vitro* de basidiósporos de *Pisolithus* spp. não-permeabilizados, na presença de diferentes plantas hospedeiras, foi demonstrado que as colônias fúngicas apareceram entre 16 e 70 dias de incubação (Kope e Fortin 1990; Carvalho et al., 1997; Costa, 2002; Pereira, 2004). Possivelmente essa variação se deve às diferentes condições de cultivo utilizadas.

Mesmo com o espalhamento dos basidiósporos em toda a superfície do meio de cultura contido nas placas de Petri, as colônias fúngicas surgiram próximas às raízes da planta hospedeira (Figura 10). Esse fato é semelhante ao relatado por Pereira (2004), durante a germinação de basidiósporos de *P. microcarpus* não-permeabilizados. A germinação de basidiósporos de fungos ectomicorrízicos próximo à raiz da planta é atribuída à liberação de compostos estimuladores da germinação pela raiz (Fries, 1981; Carvalho et al., 1997; Costa, 2002).

Embora o surgimento de colônias fúngicas tenha sido observado com duas semanas, a porcentagem de germinação total foi baixa, 0,001 %. Esse valor é semelhante aos relatados por Costa (2002) e Pereira (2004).

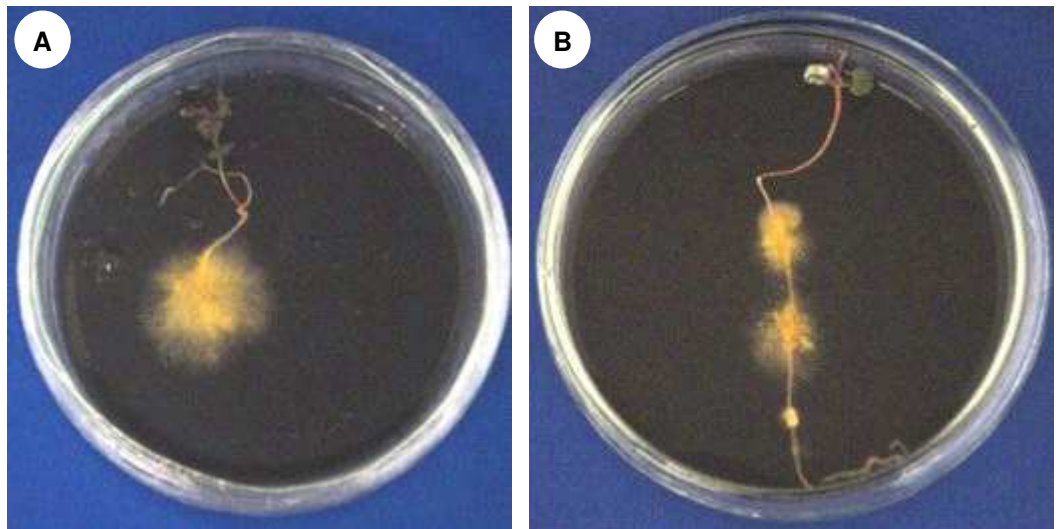


Figura 10. Colônias de *Pisolithus microcarpus* obtidas pela germinação *in vitro* de basidiósporos permeabilizados com água sanitária a 10 % por 40s. (A) Colônia isolada crescida nas proximidades da raiz de plântula de *Eucalyptus citriodora*. (B) Colônias distribuídas ao longo do eixo principal do sistema radicular de *E. citriodora*.

Estudos adicionais deverão ser conduzidos visando a elucidação dos fatores que influenciam a germinação dos basidiósporos de *P. microcarpus*, tais como a redução da hidrofobicidade e a permeabilização da parede celular, bem como as condições ideais de cultivo que favoreçam a ocorrência do processo.

5. CONCLUSÕES

- As marcas de água sanitária testadas diferem quanto à eficiência de permeabilização da parede celular dos basidiósporos.
- O tratamento dos basidiósporos com água sanitária reduz a hidrofobicidade desses propágulos.
- A permeabilização de basidiósporos de *P. microcarpus* é proporcional ao aumento na concentração de água sanitária e ao tempo de exposição a esse composto.
- O tratamento dos basidiósporos com água sanitária causa alterações na ultraestrutura da camada mais externa da parede celular (L₄), reduzindo ou eliminando as espículas.
- Foi possível obter colônias fúngicas a partir da germinação de basidiósporos permeabilizados com água sanitária a 10 % (v/v) por 40 s, porém a porcentagem de germinação total foi baixa, 0,001 %, não diferindo daquelas relatadas na literatura para basidiósporos não permeabilizados.

ANEXO 1

Tabela 1. Porcentagem de basidiósporos maduros de *P. microcarpus* permeabilizados com soluções de água sanitária em diferentes concentrações em relação à concentração original de 2,0-2,5 % de cloro ativo a diferentes tempos de contato com a solução.

Conc. ^{1/} (%)	Tempo (s)								
	5	10	20	30	40	50	60	70	80
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	1	1	1
10	3	5	5	6	12	13	14	15	15
15	4	6	8	10	11	12	14	17	19
20	4	8	10	14	14	16	16	27	32
25	15	18	20	21	24	39	40	48	69
30	15	20	27	30	36	45	48	50	58
35	16	20	28	38	40	45	52	58	61
40	19	26	29	40	42	45	60	69	76
45	50	51	56	58	68	79	82	85	87
50	51	54	57	63	77	81	83	86	88

^{1/} Concentrações finais obtidas a partir da diluição da água sanitária contida na embalagem (cloro ativo de 2,0 a 2,5 % p/p).

6. REFERÊNCIAS

- Adner, N., Zetterlund, S. Sanitization of BPG columns with sodium hydroxide. **Amersham Biosciences**, v. 18, p. 1020-86, 2002.
- Akiyama, K., Matsuoka, H., and Hayashi, H. Isolation and identification of a phosphate deficiency-induced C- glycosylflavonoid that stimulates arbuscular mycorrhiza formation in melon roots. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.15, p.334-340, 2002.
- Albertsheim, P. & Prouty, A.J. Carbohydrates, proteins, cell surfaces, and the biochemistry of pathogenesis. **Annual Review Plant Physiology**, v.26, p. 31-52, 1975.
- Bagga, S., Straney, D.; Modulation of cAMP phosphodiesterase activity by flavonoids which induce spore germination of *Nectria haematococca* MP VI (*Fusarium Solani*). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.56, p.51-56, 2000.
- Bécard, G., Kosuta, S., Tamasloukht, M., Séjalon-Delmas, N. and Roux. C. Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. **Canadian Journal of Botany**, v. 82, p. 1186–1197, 2004.
- Birraux, D., Fries, N. Germination of *Telephora terrestris* basidiospores. **Canadian Journal of Botany**, v.59, p.2062-2064,1981.
- Bonfante, P., Balestrini, R., Martino, E.; Perotto, S.; Plassard, C.; Mousain, D. Morphological analysis of early contacts between pine roots and two ectomycorrhizal *Suillus* strains. **Mycorrhiza**, v.8, p.1–10, 1998.
- Bowman, S.M. & Free, S.J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays**, v.28, p.799-808, 2006.
- Bulmer, G.S., Beneke, E.S. Germination of basidiospores of *Lycoperdon* species and *Scleroderma lycoperdoides*. **Mycologia**, v.56, p.70-76, 1964.

- Campos, A.N.R.; Costa, M.D.; Totola, 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, n.4, p. 1531-1540, 2008.
- 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, p. 477–483, 2010a.
- Campos, A.N.R.; Costa, M.D. Histochemistry and storage of organic compounds during basidiosporogenesis in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 1745–1753, 2010b.
- Carvalho, D., Rosado, S.C.S., Souza, A.M., Oliveira, A.F. Produção de culturas monocarióticas e compatibilidade sexual intra- e interpopulacional para o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*. **Cerne**, v.3, p.143-160,1997.
- Chaffin, W.L.; López-Ribot, J.L.; Casanova, M.; Daniel Gozalbo, D.; Martínez, J.P. Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans* : Identification, Function, and expression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n.1, p. 130-180, 1998.
- Costa, M.D. Germinação de esporos e formação de ectomicorizas in vitro por estirpes monocarióticas de *Pisolithus* sp. Viçosa: UFV, 2002. 153p. (Tese de Mestrado).
- Dean, R.A. Signal pathways and appressorium morphogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, p.211–234, 1997.
- Dexheimer, J.; Pargney, J.C. Comparative anatomy of the host-fungus interface in mycorrhizas. **Experientia**, v. 47, 1991.
- Douds, D.D.Jr., Nagahashi, G. The differential effects of cell wall-associated phenolics, cell walls, and cytosolic phenolics the host and non-host roots on the growth of two species of AM fungi. **New Phytologist**, v.133, p.289-294, 1996.
- Douds, D.D.Jr., Galvez, L., Bécard, G., and Kapulnik, Y. Regulation of arbuscular mycorrhizal development by plant host and fungus species in alfafa. **New Phytologist**, v.138, p.27-35, 1999.
- Estrela, C.; Estrela, C.R.A.; Hollanda, A.G.B.; Decurcio, D.A.; Pécora, J.D. Influence of iodoform on antimicrobial potential of calcium hydroxide. **Journal of Applied Oral Science**, v. 14, n. 1, p. 33-7, 2006.
- Estrela, C.; Estrela, C.R.A.; Barbin, E.L.; Spanó, J.C.E.; Marchesan, M.A.; Pécora, J.D. Mechanism of action of sodium hypochlorite. **Brazilian Dental Journal**, v. 13, n.2, p.113-117, 2002.
- Fries, N., Birraux, D. Spore germination in *Hebeloma* stimulated by living plant roots. **Experientia**, v.36, p.319-324, 1980.

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

Gianinazzi-Pearson, V., Branzanti, B., Gianinazzi, S. In vitro enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. **Symbiosis**, v.7, p.243-255, 1989.

Godinho, C.S. Compostos de reserva e permeabilização de basidiósporos de *Pisolithus microcarpus*. Viçosa: UFV, 2011. 56p. (Tese de Mestrado).

Gottlich, E. Cell-surface hydrophobicity and lipolysis as essential factors in human *tinea nigra*. **Mycoses**, v. 38, p. 489-494, 1995.

Graham, J.H. Effect of citrus root exudates on germination of chlamydospores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus epigeum*. **Mycologia**, v.74. p.831-835, 1982.

Harrison, M.J. and Dixon, R.A. Isoflavonoids accumulation and expression of defence gene transcripts during the establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations in roots of *Medicago truncatula*. **Molecular Plant-Microbe interactions**, v. 6, p. 643-654, 1993.

Hirsch, A.M. Developmental biology of legume nodulation. **New Phytologist**, v.122, p.211-237, 1992.

Inmetro. Água Sanitária: produto e segurança da embalagem. Disponível em <<http://www.inmetro.gov.br>>. Acesso em: 25 de junho. 2012.

Kershaw, M. J. & Talbot, N. J. Hydrophobins and repellents: Proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. **Fungal Genetics and Biology**, v.23, p. 18–33, 1998.

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

Kottke, I. Fungal adhesion pad formation and penetration of root cuticle in early stage mycorrhizas of *Picea abies* and *Laccaria amethystea*. **Protoplasma**, v.196, p.55-64, 1997.

Lamb, R.J., Richards, B.N. Survival potential of sexual and asexual spores of ectomycorrhizal fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 62, p.181-191, 1974.

Larose, G., Chênevert, R., Moutoglis, P., Gagné, S., Piché, Y., and Vierheilig, H. Flavonoids levels in roots of *Medicago sativa* are modulated by the developmental stage of the symbiosis and the root colonizing arbuscular mycorrhizal fungus. **Plant Physiology**, v.159, p.1329-1332, 2002.

Lei, J.; Lapeyrie, F.; Malajczuk, N.; Dexheimer, J. Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch on roots of *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake *in vitro*. **New Phytologist**, v.116, p.115-122, 1990.

Lynn, D.G., Chang, M. Phenolics signals in cohabitation: implications for plant development. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **Plant Molecular Biology**, v.41, p.497-526, 1990.

Martin, F., Lapeyrie, F., Tagu, D. Altered gene expression during ectomycorrhizal development. In: Carroll/Tudzynski (eds) *The Mycota V Part A - Plant relationships*. **Springer-Verlag**, Berlin Heidelberg, p.223-242, 1997.

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, p. 161-174, 1999.

Maxwell, C., Hartwig, U.A., Joseph, C.M., and Phillips, D.A. A chalcone and two related flavonoids released from alfalfa roots induce nod genes of *Rhizobium meliloti*. **Plant Physiology**, v.91, p. 842-847. 1989.

Mims, C.W.& Thurston, E.L. Ultrastructure of teliospore formation in the rust fungus *Puccinia podophylli*. **Canadian Journal of Botany**, v.57, p. 2533-2538, 1979.

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

Nagahashi, G., and Douds, D.D. Partial separation of root exudates components and their effects upon the growth of germinated spores of AM fungi. **Functional Ecology**, v. 104. p.1453-1464. 2000.

Nair, M.G., Safir, G.R., Siqueira, J.O. Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p.434-439, 1991.

Nehls, U.; Grunze, N.; Willmann, M.; Reich, M.; Küster, H. Sugar for my honey: carbohydrate partitioning in ectomycorrhizal symbiosis. **Phytochemistry**, v.68, p.82-91, 2007.

Ohta, A. Basidiospore germination of *Tricholoma matsutake* (I). Effects of organic acids on swelling and germination of the basidiospores. **Transactions of the Mycological Society of Japan**, v.27, p.167-173, 1986.

Ohta, A. Effects of butyric acid and related compounds on basidiospore germination of some mycorrhizal fungi. **Transactions of the Mycological Society of Japan**, v.29, p.375-381, 1988.

Pereira, G.M.D. Germinação “in vitro” de esporos de *Pisolithus* sp. Viçosa: UFV, 2004. 65p. (Tese de Mestrado).

Peterson, R.L; Bonfante, P. Comparative structure of vesicular-arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas. **Plant and Soil**, v.159, p. 79-88, 1994.

Rosenberg, M.; Gutnick, D.; Rosenberg, E. Adherence of bacteria to hydrocarbons a simple method for measuring cell surface hydrophobicity. **FEMS Microbiology Letters**. v. 9, p.29-33, 1980.

Ruiz-Herrera, J.; Leon, C.; Carabez-Trejo, A.; Reyes-Salinas, E. Structure and chemical composition of the cell walls from the haploid yeast and mycelial forms of *Ustilago maydis*. **Fungal Genetics and Biology**, v.20, p.133-142, 1996.

Rutala, W.A.; Weber, D.J. Uses of Inorganic Hypochlorite (Bleach) in health-care facilities. **Clinical Microbiology Reviews**. p. 597–610, 1997.

Salzer, P.; Hübner, B.; Sirrenberg, A.; Hager, A. Differential Effect of Purified Spruce Chitinases and β -1,3-Glucanases on the Activity of Elicitors from Ectomycorrhizal Fungi. **Plant Physiology**. v.114, p. 957-968, 1997.

Santos, M.L. Composição da parede celular dos fungos ectomicorrízicos *Pisolithus microcarpus* e *Pisolithus tinctorius*. Viçosa: UFV, 2007. 51p.:il. (Tese de Mestrado).

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

Silhacek, K.J.; Taake, K.R. Sodium Bicarbonate and Hydrogen Peroxide: The Effect on the Growth of *Streptococcus mutans*. **Journal of Dental Hygiene**, v. 79, n. 4, 2005

Silva, J.de.C. Manual prático do fazendeiro florestal: produzindo madeira com qualidade. 3.ed. Viçosa-MG: Arka Editora, 2011. 110p.

Singh, T.; Saikia, R.; Jana, T.; Arora, D.K. Hydrophobicity and surface electrostatic charge of conidia of the mycoparasitic *Trichoderma* species. **Mycological Progress**, v. 3, p.219–228, 2004.

Singla, S.; Reddy, M.S.; Marmeisse, R.; Gay, G. Genetic variability and taxonomic position of ectomycorrhizal fungus *Pisolithus* from India. **Microbiology Research**, v.159, p. 203-210, 2004.

Siqueira, J.O., Safir, G.R., and Nair, M.G. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds. **New Phytologist**, v.118, p. 87-93.1991.

Siqueira Jr, J.F.; H. P. Lopes, H.P. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. **International Endodontic Journal**, v.32, p.361-369, 1999.

Suzuki, A. Basidiospores germination by aqua ammonia in *Hebeloma vinosophyllum*. **Transactions of the Mycological Society of Japan**, v.19, p.362, 1978.

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

Tagu, D., Lapeyrie, F., Ditengou, F., Lagrange, H., Laurent, P., Missoum, N., Nehls, U., Martin, F. Molecular aspects of ectomycorrhiza development. In: Podila GK, Douds DD Jr (eds) **Current Advances in Mycorrhizae Research**, The American Phytopathological Society, St Paul, p. 69- 89, 2000.

Tsai, S.M., Phillips, D.A. Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores in vitro. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p.1485-1488,1991.

Tawaraya, K., Watanabe, S., and Yoshida, E. Effect of onion (*Alium cepa*) root exudates on the hyphal growth of *Gigaspora margarita*. **Mycorrhiza**, v. 6, p. 57-59, 1996.

Valera, M. C.; Silva, K.C.G.; Maekawa, L.E.; Carvalho, C.A.T.; Koga-Ito, C.Y.; Camargo, C.H.R.; Lima, R.S. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite associated with intracanal medication for *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* inoculated in root canals. **Journal applied oral science**. v. 17, n.6, p.555-559, 2009.

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

Xie, Z.P., Staehelin, C., Vierheilig, H., Wiemken, A., Jabbouri, S., Broughton, W.J., Vögeli-Lange, R., and Boller, T. Rhizobial nodulation factors stimulate mycorrhizal colonization of nodulatin and nonnodulating soybeans. **Plant Physiology**, v.108, p. 1. 1995.

Webster, P. Microwave-assisted processing and embedding for transmission electron microscopy. In: Kuo, J. (ed.) Electron microscopy. **Methods and protocols**. 2 edition, Humana Press, New Jersey, p. 47-67, 2007.

Wösten, H. A. B.; Schuren, F. H. J.; Wessels, J. G. H. Interfacialself-assembly of a hydrophobin into an amphipathic protein membranemediates fungal attachment to hydrophobic surfaces. **EMBO Journal**, v.13, p.5848–5854, 1994.

Zehnder, M. Root canal irrigants. **Journal of Endodontics**,v.32, p.389–98, 2006.