

ANDRÉ NARVAES DA ROCHA CAMPOS

**FORMAÇÃO DE BASIDIÓSPOROS
NO FUNGO ECTOMICORRÍZICO *Pisolithus* sp.**

Tese 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
2005

RESUMO

Campos, André Narvaes da Rocha, M.S., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2005. **Formação de basidiósporos no fungo ectomicorrízico *Pisolithus* sp.** Orientador: Maurício Dutra Costa. Conselheiros: Arnaldo Chaer Borges e Marisa Vieira de Queiroz.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a formação de basidiósporos de *Pisolithus* sp., bem como os eventos de meiose, mitose pós-meiótica e o acúmulo de reservas lipídicas durante o desenvolvimento dos basidiocarpos fúngicos. Os estudos foram conduzidos em corpos de frutificação frescos, coletados sob florestas de *Eucalyptus* spp., na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. Os eventos envolvidos na formação dos basidiósporos foram analisados utilizando-se técnicas de microscopia ótica, microscopia de fluorescência, microscopia eletrônica de varredura e cromatografia gasosa. *Pisolithus* sp. produz oito esporos por basídio, envolvidos em matriz gelatinosa, no interior dos peridíolos constituintes do basidioma. Os esporos apresentam de 6 a 8 μm de diâmetro, são globosos, equinatos, com espículas embotadas. Previamente à formação dos basidiósporos, as células das hifas constituintes do peridíolo diferenciam-se em basídios clavados com 12 a 18 μm de comprimento e 6 a 8 μm de diâmetro. Os basidiocarpos apresentam abundante quantidade de lipídeos totais distribuídos nos basídios e nos esporos. A análise da composição de ácidos graxos revelou a presença de 17 compostos com cadeias de 14 a 20 carbonos, na maioria insaturados, contendo uma ou duas insaturações. A composição e o conteúdo em ácidos graxos variou de acordo com o estágio de desenvolvimento dos peridíolos. Nos basidiósporos livres, os

ácidos graxos predominantes foram 16:0, 16:1w5c, 18:1w9c e a mistura 18:2w6,9c/18:0ante, sugerindo que o ácido oléico seja o principal ácido graxo constituinte das reservas lipídicas dos basidiósporos. Na formação do diplóide, a cariogamia pode ocorrer tanto no basídio quanto nas células das hifas sub-basidiais ou sub-apicais, seguindo-se os eventos característicos da divisão meiótica. Após a formação da tétrade meiótica nos basídios, há a ocorrência de uma rodada de divisão nuclear mitótica, resultando na produção de oito núcleos na célula basidial. Os núcleos formados migram para dentro dos basidiósporos de forma assincrônica. Durante os eventos de migração, os núcleos haplóides adquirem a forma de fuso, sugerindo a participação de microtúbulos no transporte dessas organelas. Este estudo constitui o primeiro relato dos processos de divisão e migração nuclear em *Pisolithus* durante a formação dos basidiósporos e da presença e distribuição de ácidos graxos no basidiocarpo desse fungo. O conhecimento das etapas de formação dos basidiósporos e das características das reservas de carbono presentes nesses propágulos permitirá o desenvolvimento de estratégias que visem elucidar os fatores que influenciam o processo de germinação dos basidiósporos de *Pisolithus* sp., viabilizando a utilização desses esporos como inoculantes, em viveiros florestais, e na pesquisa genética focalizada na associação ectomicorrízica.

ABSTRACT

Campos, André Narvaes da Rocha, M.S., Universidade Federal de Viçosa, January, 2005. **Basidiospore formation in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus* sp.** Advisor: Maurício Dutra Costa. Committee members: Arnaldo Chaer Borges and Marisa Vieira de Queiroz.

The objective of this work was to characterize the formation of *Pisolithus* sp. basidiospores as well as the events of meiosis, post-meiotic mitosis, and the accumulation of lipid reserves during the development of the fungal basidiocarps. This study was conducted in fresh fruit bodies collected under *Eucalyptus* spp. forests at Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. The events involved in the development of the basidiospores were analyzed using light microscopy, fluorescent microscopy, scanning electron microscopy, and gas chromatography. *Pisolithus* sp. produces eight spores per basidium imbedded in a gelatinous matrix inside the peridioles constituting the basidiome. The spores are, approximately, 6 to 8 μm in diameter, globose, echinate, with blunt spines. Previously to the formation of the basidiospores, hyphal cells forming the peridioles differentiate into clavate basidia with 12 to 18 μm in length, and 6 to 8 μm in width. The basidiocarps present abundant quantities of total lipids distributed in hyphae, basidia, and basidiospores. Composition analyses of fatty acids revealed the presence of 17 compounds with 14 to 20 carbon atoms, mostly unsaturated, containing one or two unsaturations. The composition and content of fatty acids varied according to the developmental stage of the peridioles. Inside free basidiospores, the predominant fatty acids were 16:0, 16:1w5c, 18:1w9c, and the mixture 18:2w6,9c/18:0ante, suggesting that oleic acid is the main fatty acid making up the lipid reserves of the spores.

During diploid formation, karyogamy can take place either in the basidia as well as in subbasidial or subapical hyphal cells, followed by the typical events of meiotic division. After the formation of the meiotic tetrad in the basidia, one round of mitotic nuclear division occurs, resulting in the production of eight nuclei per basidial cell. The newly-formed nuclei migrate into basidiospores asynchronously. During the migration events, the haploid nuclei acquire a fusiform shape, suggesting the participation of microtubules in the nuclear transport into spores. This work is the first report on the nuclear division and migration in *Pisolithus* during the formation of basidiospores and on the presence and distribution of fatty acids in the basidiomata of this fungus. A thorough understanding of the main stages of basidiospore formation and of the main characteristics of the carbon reserves present within these spores will allow the development of strategies aiming at the elucidation of the factors that influence the germination of *Pisolithus* sp. basidiospores. This will ultimately make possible the use of these spores as inoculants in forest nurseries and in the genetic research focused on the ectomycorrhizal association.