

BOMBAS DE H⁺ NA INTERAÇÃO SIMBIÓTICA *Pisolithus microcarpus-Eucalyptus urograndis*: EFEITOS DO ALUMÍNIO E O PAPEL DA MELANINA

AMANDA AZEVEDO BERTOLAZI

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO - 2013**

BOMBAS DE H⁺ NA INTERAÇÃO SIMBIÓTICA *Pisolithus microcarpus-Eucalyptus urograndis*: EFEITOS DO ALUMÍNIO E O PAPEL DA MELANINA

AMANDA AZEVEDO BERTOLAZI

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Arnaldo Rocha Façanha

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2013

BOMBAS DE H⁺ NA INTERAÇÃO SIMBIÓTICA *Pisolithus microcarpus-Eucalyptus urograndis*: EFEITOS DO ALUMÍNIO E O PAPEL DA MELANINA

AMANDA AZEVEDO BERTOLAZI

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovada em 22 de março de 2013

Comissão Examinadora:

Dr. Alessandro Coutinho Ramos – LMAB/UVV

Dr. Marco Antônio Martins – LSOL/CCTA/UENF

Dra. Liane Cristina da Silva Ferreira – PNP/ENF

Dr. Arnaldo Rocha Façanha – LMGV/CCTA/UENF - Orientador

AGRADECIMENTOS

À minha mãe que está sempre presente me apoiando em todos os momentos da minha vida. Obrigada por acreditar nos meus sonhos e ajudar a me tornar sempre uma pessoa melhor. E ao meu Pai, pela oportunidade, confiança, carinho e orgulho demonstrado por mim;

À minha família por ser perfeita mesmo com seus defeitos e por ser a melhor família que alguém poderia desejar. Vocês são os pilares que me sustentam;

Ao meu orientador Arnaldo Rocha Façanha pela confiança, pelos valiosos ensinamentos, pela grande paciência e por estar me ajudando a me tornar uma pesquisadora apaixonada pela ciência;

Ao meu amigo e ex-orientador Alessandro Coutinho Ramos, eu tenho a agradecer por ter me iniciado no caminho da pesquisa e me apoiado durante esses anos com sua amizade, carinho e dedicação;

Aos amigos do LBCT, em especial, Inga, Josimara e Julianna, em todos os momentos do meu mestrado me ajudando a me adaptar ao laboratório, a realizar os experimentos e nos momentos de risadas e diversões. Vocês fazem parte desse trabalho e da minha vida;

Aos meus amigos de Vila Velha e Vitória (Aline, Mari, Babi, Rê, Loh e Tulli), do LMAB (Juju, Suellen, Gabi, Arthur, Maísa, Fred, Marcelo, Elias e toda a galera)

e de Campos (Nayara, Manu, Sussu e Clara) obrigada pelo apoio e por fazerem minha vida tão mais feliz;

Ao meu namorado Lucas, pela ajuda, pelos puxões de orelha e incentivos na hora de escrever, por me acalmar e pelo carinho sempre;

Aos professores, aos técnicos de laboratório do LBCT e às secretárias da pós-graduação da produção vegetal pela ajuda em alguns experimentos, pela atenção e pelo ótimo convívio durante esses anos de mestrado;

À professora Anna Levovna Okorokova pelas sugestões e contribuições;

Ao professor Luciano Pasqualoto Canellas e à sua aluna Natália Aguiar pela análise de infravermelho, ajuda na liofilização do material e concessão do espaço para crescimento das plantas;

Aos doutores Marco Antônio e Liane Cristina por aceitarem fazer parte da banca de defesa;

A Capes e a FAPERJ pelo apoio financeiro concedido;

A UENF pelas instalações e estrutura para o desenvolvimento desta pesquisa;

A todos que me ajudaram de forma direta ou indireta na execução deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Raízes e Fungos Micorrizicos: Um Sistema Dinâmico Chamado Micorriza.....	4
2.2. Papel das Bombas de Prótons nas Células de Plantas e Fungos...	9
2.3. Toxicidade do Alumínio.....	11
2.4. Os Pigmentos Melânicos.....	13
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. Objetivo Geral.....	20
3.2. Objetivos Específicos.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1. Preparo de Meio de Cultura Para Crescimento do Fungo.....	22
4.2. Obtenção e Multiplicação do Fungo.....	22
4.3. Cultivo do Fungo em Meio Líquido.....	23
4.4. Extração do Pigmento Fúngico.....	23
4.5. Caracterização Espectrográfica (Infravermelho com Transformada de Fourier) do Pigmento Fúngico.....	24
4.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	24

4.7. Especificação do Meio MNM.....	24
4.8. Experimento Com Alumínio em Placas de Petri.....	25
4.9. Ensaio com o Fungo <i>Pisolithus microcarpus</i> em Meio Contendo Alumínio <i>In vivo</i>	25
4.10. Obtenção da Fração Microssomal das Hifas Fúngicas.....	25
4.11. Atividade da Hidrólise de ATP <i>In vivo</i> e <i>In vitro</i> das Hifas Fúngicas.....	26
4.12. Plantio de <i>Eucalyptusurograndis</i>	27
4.13. Obtenção da Fração Microssomal de Raízes de <i>Eucalyptus urograndis</i>	28
4.14. Atividade da Hidrólise de ATP das ATPases do tipo P, V, F e H ⁺ -PPase.....	29
4.15. Ensaio Com Melanina e Alumínio <i>In vitro</i>	30
4.16. Análise dos Dados.....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão das Hifas Fúngicas.....	31
5.2. Caracterização Espectrográfica da Melanina.....	35
5.3. Hifas Fúngicas.....	36
5.3.1. Avaliações de Susceptibilidade ao Al em Placas de Petri (<i>In vitro</i>).....	36
5.3.2. Atividade ATPásica das Hifas Fúngicas.....	40
5.3.3. Ação do alumínio <i>In vitro</i> e <i>In vivo</i> sobre as bombas de prótons.....	44
5.4. Atividade ATPásica de Raízes de <i>Eucalyptus urograndis</i>	47
5.5. <i>Pisolithus microcarpus</i> x <i>Eucalyptus urograndis</i>	49
5.6. <i>Eucalyptus urograndis</i> x Alumínio x Melanina.....	51
6. CONCLUSÕES.....	54
7. REFERÊNCIAS.....	55

RESUMO

As ectomicorrizas consistem em uma associação simbiótica entre as raízes das plantas e os fungos do solo. Estes fungos podem melhorar o crescimento e as funções das raízes, além de induzirem a resistência contra metais tóxicos, incluindo o alumínio, através de mecanismos envolvendo a participação das H⁺-ATPases e melaninas fúngicas. O objetivo deste trabalho foi analisar as interações entre as bombas de H⁺ e as melaninas fúngicas, nos mecanismos adaptativos ao Al na simbiose ectomicorrízica. A atividade das bombas de H⁺ foi analisada com alumínio *in vivo* (10 – 1000 µM) e *in vitro* (5 – 1000 µM), em vesículas membranares isoladas de hifas fúngicas e raízes de *Eucalyptus urograndis*. O crescimento fúngico não foi inibido em placas de petri contendo meio sólido suplementado com Al com concentrações de até 1000 µM. Na mesma faixa de concentração de Al, a hidrólise de ATP das H⁺-ATPases do tipo P e V isoladas das hifas fúngicas não sofreu mudanças significativas sob o efeito deste metal *in vitro*, sugerindo que as bombas de H⁺ sejam altamente insensíveis a altas concentrações de Al. Por outro lado, *in vivo*, um claro efeito estimulatório foi observado nas duas bombas de H⁺, isoladas das hifas do *P. microcarpus*, em baixas concentrações de Al (10 µM). A atividade hidrolítica das ATPases de plasmalema e tonoplasto de raízes de eucalipto, submetida ao tratamento com Al *in vitro* sofreu modulações diferenciais em resposta a este metal, em que a concentração de 5 µM provocou um estímulo na atividade da P-H⁺-ATPase e da

F₁F₀-ATPase, a atividade hidrolítica da V-H⁺-ATPase foi inibida em todas as concentrações e a atividade da H⁺-PPase não sofreu alterações significativas, com uma tendência, no entanto, para inibição. As raízes de eucalipto em associação com o *P. microcarpus*, submetidas às doses de 0, 200 e 1000 µM de Al *in vivo*, apresentaram valores maiores de hidrólise do ATP em relação às plantas não inoculadas, demonstrando o efeito benéfico deste fungo em amenizar o efeito tóxico deste metal sobre as raízes das plantas. A adição de melanina fúngica *in vitro* inibiu a atividade hidrolítica das P-H⁺-ATPases de raízes de eucalipto, inclusive na presença da maior concentração de Al testada (500 µM). O tratamento somente com metal, também provocou uma inibição, menos acentuada, da atividade hidrolítica de tais bombas, sugerindo que o efeito inibitório do Al estaria sendo potencializado pelo tratamento com melanina. Tal ação é contrária à relatada na literatura, que descreve a melanina como um poderoso quelante de metais. Foi verificado um gradiente eletroquímico de prótons somente na reação sendo iniciada com a proteína, sugerindo a participação das melaninas em um sistema redox, atuando na energização da membrana plasmática. Juntos, esses resultados fornecem a primeira evidência de uma inibição das bombas de H⁺ moduladas pela melanina, juntamente relacionada pela notável tolerância ao Al desenvolvida por esta simbiose.

Palavras-chave: ATPase, metal, ectomicorriza, pigmento melânico, regulação.

ABSTRACT

Ectomycorrhizal consists in a plant-fungi symbiosis, which can improve root growth and function, and also induce resistance against toxic metals, including aluminum, through mechanisms involving the participation of H⁺-ATPases and fungal melanins. The aim of this work was to analyze the interactions between H⁺ pumps and fungal melanins in the adaptive mechanisms to Al of this mycorrhizal symbiosis. The H⁺ pumps activity was analyzed with aluminum *in vivo* (10 – 1000 μM) and *in vitro* (5 – 1000 μM) from membrane vesicles of fungal hyphae and *Eucalyptus urograndis* roots. The fungal growth was not inhibited in a medium supplemented with aluminum at concentrations up to 1000 μM. In the same range of Al concentration, the ATP hydrolysis of both P- and V-type H⁺-ATPases did not change significantly when this metal was added *in vitro*, suggesting that these H⁺ pumps are highly insensitive to high doses of Al. On the other hand, *in vivo*, a clear stimulatory effect was found in both H⁺ pumps, isolated from *P. microcarpus* hyphae, at low Al concentrations (10 μM). The hydrolytic activity of the plasmalemma and tonoplast ATPases of eucalyptus roots, treated with Al *in vitro* had a differential modulation in response to this metal, that the 5 μM concentration stimulated the P-H⁺-ATPase and F1F0-ATPase hydrolytic activity, the P-H⁺-ATPase and the F1F0-ATPase hydrolytic activity was inhibited in all Al concentrations and the H⁺-PPase activity was not changed, with a tendency to inhibition. Eucalyptus roots inoculated with *P. microcarpus*, treated with 0, 200 and

1000 μM Al *in vivo*, showed higher ATP hydrolysis than non-inoculated plants, demonstrating this mycorrhizal beneficial effect, softening the Al toxic action on eucalyptus roots. Addition of fungal melanin *in vitro* inhibited the P-H⁺-ATPases of eucalyptus roots, also in the presence of the highest Al concentration (500 μM). The metal alone also caused a light inhibition on the plasmalemma H⁺ pump activity, suggesting that the Al inhibitory effect was being potentiated by melanin. Such melanin inhibitory action is contrary to those described in literature, that melanin act as a metal chelator. It was verified an electrochemical proton gradient only in the reaction initiated with the protein, suggesting a melanin participation in a redox system, acting in plasmatic membrane energization. Taken together, these results provide the first evidence for an inhibition of the proton pumps modulated by melanin, closely related to the remarkable Al tolerance developed in this symbiotic interaction.

Keywords: ATPase, metal, ectomycorrhizal, pigment, regulation.

1. INTRODUÇÃO

O aumento das atividades humanas e naturais tem contribuído para uma crescente contaminação ambiental por metais, passando a representar uma importante fonte de poluição dos solos (Khan et al., 2000; Bisinotti et al., 2004). Uma vez presentes em concentrações consideradas tóxicas, estes elementos transformam o solo em um ambiente hostil para os organismos que nele habitam, impedindo o crescimento e/ou desenvolvimento destes através de efeitos tóxicos em níveis celulares e moleculares (Harms et al., 2011).

O uso de bioinóculos baseados em microrganismos simbióticos promove estratégias agroecológicas mais promissoras na recuperação de solos degradados, com destaque para as micorrizas. Estas associações de fungos com raízes de plantas consistem em uma simbiose mutualística, em que o fungo é beneficiado com carboidratos provenientes de fotossíntese e a planta beneficia-se com água e nutrientes absorvidos pelas hifas fúngicas, além da proteção fornecida pelas estruturas miceliais (Smith e Read, 1997). Tal proteção pode oferecer resistência a patógenos do solo (Chakravarty e Unestam, 1987), a estresses abióticos como seca (Osonubi et al., 1991), ou ao acúmulo de elementos tóxicos como os metais (Colpaert e Van Assche, 1993). A efetividade de uma diversidade de associações entre fungos e plantas, em relação ao crescimento destas em substratos contendo metais, foi testada e comprovada

para vários metais. Esta proteção está relacionada a uma série de mecanismos extra e intracelulares, dos quais os fungos dispõem (Gadd, 1993).

Os pigmentos melânicos consistem em substâncias de alto peso molecular, sem estrutura química definida e resistentes à degradação. São sintetizados por animais, vegetais e fungos, sendo que nestes últimos, as melaninas contribuem de maneira significativa como uma proteção contra metais. Estes pigmentos podem estar ligados à parede da célula fúngica ou então estar presentes no meio extracelular, agindo como quelantes, além de fornecerem maior rigidez à parede. (Fogarty e Tobin, 1996). Os metais podem provocar um aumento na produção de melanina, através do estímulo da produção de produtos intermediários da sua via de síntese ou do aumento da atividade de enzimas chave, como as tirosinases e as laccases, as quais atuam na sua biossíntese (McGraw, 2003).

As melaninas podem desempenhar papéis fundamentais, mas ainda não descritos, na associação micorrízica, principalmente considerando as características químicas e físico-químicas que estes pigmentos compartilham com os ácidos húmicos (Senesi et al., 1997). Estes complexos orgânicos compreendem a maior fração das substâncias húmicas e tem sido constatado o seu efeito positivo sobre as plantas, particularmente no sistema radicular e na absorção de nutrientes (e.g., Dobbss et al., 2007; Canellas et al., 2008). Este efeito relacionado à teoria do crescimento ácido envolve a ação de auxinas sobre as H^+ -ATPases de membrana plasmática, promovendo um aumento da extrusão de prótons e da acidificação do apoplasto, ativando expansinas que favorecem a extensibilidade da parede celular. Foi demonstrado que os ácidos húmicos possuem grupamentos do tipo auxínico em sua estrutura, e que estes promovem o aumento da atividade das H^+ -ATPases de membrana plasmática, assim como promovem o desenvolvimento radicular de certas culturas, como o café e o milho (Façanha et al., 2002).

No presente trabalho buscou-se uma compreensão mais precisa e abrangente do papel das melaninas fúngicas, não somente como partícipes de um mecanismo protetor contra metais, mas também tentando elucidar sua possível implicação bioquímica no desenvolvimento vegetal e de fungos micorrízicos. A melhor compreensão dos fenômenos inerentes à bioatividade das melaninas fúngicas sobre o metabolismo de cada um dos simbioses, deverá fornecer elementos essenciais tanto para a pesquisa básica da interação

simbiótica micorrízica quanto para o desenvolvimento biotecnológico e agroecológico aplicado à recuperação de áreas degradadas por contaminação de metais e solos ácidos em geral.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Raízes e Fungos Micorrizicos: um Sistema Dinâmico Chamado Micorriza

As micorrizas são associações simbióticas mutualísticas entre os fungos do solo e as raízes das plantas. Esta associação surgiu há cerca de 450 milhões de anos e tem sido considerada de vital importância para a evolução das plantas terrestres (Smith e Read, 2008).

São reconhecidos três grupos principais de micorrizas: as micorrizas arbusculares caracterizadas pelo desenvolvimento de hifas inter e intracelular, formando intracelularmente estruturas como arbúsculos e vesículas; as ectomicorrizas cujo desenvolvimento intenso de hifas ao redor da raiz forma uma estrutura chamada de manto e o desenvolvimento ao redor das células do córtex forma a rede de Hartig, sem ocorrer a penetração de hifas nas células vegetais; e as micorrizas orquidoides, restritas às plantas da família Orchidaceae, possuindo crescimento intracelular de hifas formando estruturas emaranhadas e elaboradas, os pelotons, cuja função é fornecer açúcares simples para o embrião da planta (Smith e Read 2008; Imhof, 2009).

Neste trabalho o objeto de estudo são as ectomicorrizas, cujo desenvolvimento da simbiose inclui quatro estágios. No estágio de pré-infecção ocorre o reconhecimento da hifa pelo hospedeiro e vice-versa, em que o fungo é

atraído em direção à raiz através da germinação do esporo ou por um propágulo fúngico existente no solo, ocasionando a ramificação e o crescimento direcional da hifa e o estímulo do desenvolvimento de raízes laterais. Em seguida ocorre o estágio de Iniciação no qual a hifa estabelece contato físico se aderindo às células epidérmicas da raiz e começando a se diferenciar em diversas camadas ao redor da raiz formando o manto, e no interior da raiz, entre as células epidérmicas e corticais, formando a rede de Hartig, sendo este o estágio de diferenciação. Por fim, no estágio de funcionamento, ocorre a troca bidirecional de nutrientes entre os simbioss, estabelecendo um equilíbrio em termos de colonização (Horan et al., 1988; Le Quéré et al., 2005).

No estágio de pré-infecção a hifa sente a presença da raiz hospedeira, uma vez que a planta secreta certas moléculas de sinalização na rizosfera, as quais parecem promover a germinação do esporo e o crescimento das hifas (Tagu et al., 2002). Foi demonstrado que o flavonol rutina liberado pelas raízes de Eucalipto estimula o crescimento das hifas do fungo *Pisolithus microcarpus* (Lagrange et al. 2001), assim como a citoquinina zeatina foi capaz de induzir a ramificação em hifas de ectomicorrizas (Martin et al. 2001). Em exsudatos radiculares de *Pinus sylvestris* o ácido abiético foi identificado como indutor da germinação de esporos de *Suillus spp* (Fries et al., 1987).

Os fungos ectomicorrízicos também possuem moléculas sinalizadoras que modificam a morfologia radicular. Slankis (1973) reportou que raízes de *Pinus* não micorrizadas tratadas com auxina exógena, se desenvolviam similarmente às raízes de ectomicorrizas, a partir daí diversos autores relataram o envolvimento da auxina como molécula chave na sinalização e modificação do desenvolvimento da raiz durante o estabelecimento desta simbiose (Nehls, et al., 1998; Felten et al., 2009). Porém, em alguns fungos ectomicorrízicos até o mais alto nível de auxina produzida parece ser muito baixo para ser responsável pelo desenvolvimento de raízes laterais, como demonstrado pelo trabalho de Karabaghli-Degron et al. (1998), no qual foi necessário de 100-500 μM de AIA exógeno para que ocorresse o desenvolvimento de raízes laterais em Norway spruce. No entanto, quando em simbiose com o fungo *Laccaria bicolor*, o qual produz apenas 10 nm de AIA, o estímulo de raízes laterais foi notável.

Desta forma, uma nova teoria tem sido proposta, a qual sugere que a auxina produzida pelo fungo mudaria os níveis internos deste hormônio na planta,

provocando a morfogênese radicular típica de ectomicorrizas (Splivallo et al. 2009; Felten et al., 2010). Sun et al., (2009) relataram que o transporte polar de auxina foi necessário para que o fungo pudesse estimular a formação de raízes laterais em plantas de *Arabidopsis*. Inclui um membro específico da família PIN (proteínas transportadoras responsáveis pelo transporte polar de auxina) PtPin9 foi identificado como sendo necessário para o estímulo de raízes laterais induzidas pelo fungo ectomicorrízico. Esta proteína também é responsiva aos jasmonatos, compostos voláteis que, assim como o etileno, podem estar envolvidos em influenciar indiretamente a biossíntese de auxina nos tecidos vegetais (Stepanova et al. 2007; Fukaki e Tasaka, 2009).

Outra molécula produzida pelos fungos micorrízicos, encontrada em grandes quantidades em culturas axênicas do fungo *Pisolithus microcarpus* e altamente produzida na formação da ectomicorriza é o alcaloide indólico hifaforina (Beguiristain et al., 1995). Esta interfere na actina, no citoesqueleto microtubular (Ditengou et al. 2003) e no fluxo de cálcio dos pelos radiculares (Dauphin et al. 2007). Além disso, tem sido constatado que esta molécula age como um antagonista da auxina, pois promove uma redução na elongação dos pelos radiculares, que é uma característica marcante do desenvolvimento da ectomicorriza (Ditengou et al., 2000).

No entanto, em um trabalho feito por Nehls, et al., (1998) foi demonstrada a capacidade da hifaforina de regular em raízes de eucalipto, a expressão de um gene regulado pela auxina, EgHypar, o qual codifica uma glutathione-S-transferase. Este gene também é regulado upstream durante a formação da ectomicorriza. Além disso, tem sido sugerida a participação da hifaforina em regular o transporte de AIA, induzir um mecanismo de detoxificação celular específico de auxina, competir com o AIA por algum receptor ou interferir no sinal de transdução da auxina (Baptista et al., 2011).

Existe uma alta especificidade fungo-hospedeiro quando se trata da associação ectomicorrízica, diferentemente como ocorre com as micorrizas arbusculares, as quais formam associações com 70% a 90% das espécies de plantas terrestres (Parniske, 2008). Por exemplo, em se tratando do fungo *Pisolithus microcarpus*, o qual é objeto deste estudo, existem duas estirpes diferentes, uma específica de *Pinus spp.* e outra específica de *Eucalyptus spp* (Krüchner e Filho, 1979). Em um estudo realizado por Dell et al., (1994) duas

estirpes de cada fungo, *Scleroderma* e *Pisolithus*, promoveram um maior acúmulo de massa seca quando micorrizados com *Eucalyptus grandis* do que quando micorrizados com *Casuarina equisetifolia* e *Allocasuarina littoralis*, além das associações com *Eucalyptus* e *Allocasuarina* terem manto e rede de Hartig totalmente diferenciados das associações com *Casuarina*.

A formação de ectomicorrizas no campo depende de vários fatores ambientais como disponibilidade de nutrientes, pH do solo, temperatura, disponibilidade de água, aeração, intensidade luminosa, interações com os microrganismos do solo e a toxicidade de certos pesticidas (Augé et al., 2001; Alves et al., 2001; Tagu et al., 2002).

Os benefícios desta associação para a planta têm sido detalhadamente relatados, entre eles o mais comumente observado é a capacidade do fungo em solubilizar e absorver o fósforo (P) orgânico do solo, possibilitando que plantas micorrizadas possuam maior quantidade de P do que plantas sem micorriza (Lapeyrie et al., 1991; Colpaert et al., 1999). Além do P, as ectomicorrizas possuem a capacidade de mobilizar outros nutrientes essenciais para as plantas a partir de fontes de minerais insolúveis, através de excreção de ácidos orgânicos, contribuindo, conseqüentemente, para a ciclagem de nutrientes e o equilíbrio dos fluxos desses elementos em ecossistemas florestais (Landerweert et al., 2001). As ectomicorrizas também fornecem uma maior proteção contra a seca como constatado por Osonubi et al., (1991) estudando *Acacia auriculiformis* e *Laucaena leucocephala* inoculadas com o fungo *Boletus suillus*, em que as plantas micorrizadas evitaram a perda de água mantendo um maior potencial de pressão do xilema e conteúdo de água na folha.

Espécies vegetais como *Pinus sylvestris* e *Pseudotsuga menziesii* em associação com *Laccaria laccata* e *Pisolithus microcarpus* também se beneficiam da proteção contra patógenos como o *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* e *Rhizoctonia solani*. Hipotetiza-se que esta proteção ocorra devido ao fungo micorrízico estimular a planta a produzir compostos fenólicos, os quais promovem uma resistência da raiz a patógenos, ou então o fato do fungo formar uma associação com a planta, estimular o seu crescimento e assim aumentar a sobrevivência de plantas jovens (Chakravarty e Unestam, 1987; Sylvia e Sinclair, 1983).

Foi testado e comprovado o melhoramento dos efeitos da toxicidade de diversos metais, como Cd, Zn, Cu, Cr, Ni, Al, Mn e Pb nas plantas colonizadas por fungos ectomicorrízicos (Van Tichelen et al., 2001; Adriaensen et al., 2003; Dueié, et al., 2008). No entanto, os mecanismos envolvidos em aumentar essa tolerância são diversos (Figura 2) e possuem uma alta especificidade entre metais, plantas e fungos (Hartley et al., 1997). Por exemplo, em um estudo feito por Ray et al., (2005) foi testado o nível de tolerância de oito ectomicorrizas em relação a diversas concentrações de seis diferentes metais (Al, As, Cd, Cr, Ni e Pb), concluindo que apenas três isolados (*Hysterangium incarcerationum*, *Laccaria fraterna* e *Pisolithus microcarpus*) apresentaram tolerância considerável aos metais em questão.

O manto fúngico pode consistir em uma barreira impedindo a absorção dos metais pela planta hospedeira (Khan et al., 2000). Também existem mecanismos bioquímicos, os quais incluem processos de precipitação extracelular e processos que ocorrem na parede celular como cristalização e biossorção através da adsorção química, física ou de troca iônica. Podem ocorrer também processos internos nas células dos fungos, em que os metais são complexados, compartimentalizados ou volatilizados (Gadd, 1993).

A parede celular do fungo possui uma importante propriedade de proteção, pois representa a primeira barreira ao acesso de metais e outros solutos potencialmente tóxicos à célula e também afeta, indiretamente, a composição iônica intracelular pelo fato de restringir a água celular (Gadd, 1993). Ácidos orgânicos e pigmentos como a melanina estão presentes na hifosfera e podem complexar ou precipitar os metais. O ácido cítrico pode ser um eficiente quelante metal-íon e o ácido oxálico pode interagir com os metais na sua forma iônica e formar cristais insolúveis de oxalato ao redor da parede celular e no meio externo (Murphy e Levy, 1983; Sutter et al., 1983).

A principal função descrita até então para as melaninas fúngicas tem sido relacionada à sua atividade quelante e sua alta afinidade por metais como Pb, Cu, Ni, Co, Mn, entre outros (Larsson e Tjalve, 1978). Estudos utilizando ressonância eletrônica de spin demonstraram que o mecanismo de interação dos íons metálicos com este pigmento ocorre através da ligação destes ao centro radical da o-semiquinona existente nos polímeros de melanina formando complexos quelantes (Felix et al., 1978).

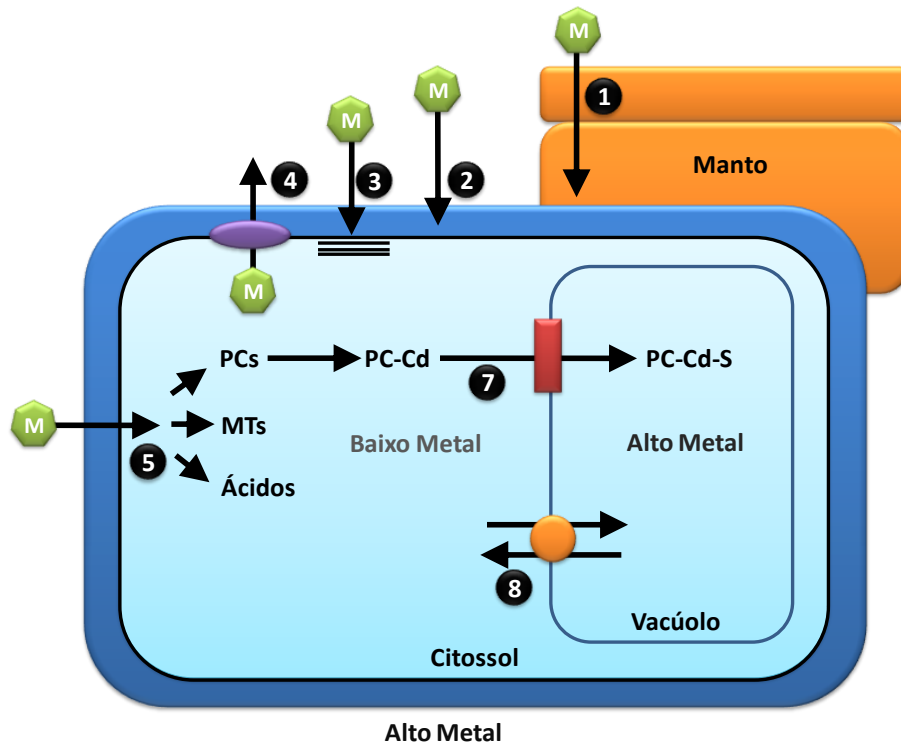


Figura 2: Resumo dos potenciais mecanismos de detoxificação dos metais pesados em uma célula fúngica. Manto atuando como uma barreira física (1), biosorção da parede celular (2), diminuição do fluxo através da membrana plasmática (3), efluxo dos metais através de proteínas de membrana (4), quelatção dos metais no citosol por compostos como fitoquelatinas, metalotioneínas ou ácidos (5), transporte do complexo PC-metal para dentro do vacúolo (7) e transporte e acumulação dos metais no vacúolo (8). Adaptado de Hall, (2002).

2.2. Papel das Bombas de Prótons nas Células de Plantas e Fungos

O transporte de metais na membrana plasmática ocorre devido à presença de transportadores primários e secundários. As bombas são proteínas de membrana que realizam o transporte ativo primário de íons como o H^+ ou Ca^{2+} , gerando um gradiente eletroquímico ao transportar íons contra um gradiente de concentração, utilizando-se para isso compostos ricos em energia como o ATP. Os principais tipos de bombas eletrogênicas são as H^+ -ATPases do tipo P localizadas na membrana plasmática (plasmalema), H^+ -ATPases do tipo V e H^+ -

Pirofosfatases (H^+ -PPases) localizadas nas membranas de vacúolos (tonoplastos) (Taiz e Zeiger, 2002).

Outro mecanismo é necessário para direcionar a absorção ativa da maioria dos nutrientes, chamado transporte secundário de H^+ . Nele os solutos podem ser transportados pela membrana, a favor de um gradiente eletroquímico, por meio da combinação do H^+ com o íon. Este tipo de co-transporte é denominado de transporte secundário de H^+ , em que a energia necessária para esta ação é proveniente da força próton-motriz, gerada pela hidrólise do ATP realizada pelas H^+ -ATPases (Morsomme e Boutry, 1999).

O efluxo de íons na membrana plasmática e o transporte destes para dentro dos vacúolos são dois mecanismos potencialmente importantes para reduzir os níveis de metais tóxicos no citosol e garantir a tolerância a tais metais (Hall, 2002). Existem poucas evidências diretas em relação ao efluxo de metais realizado pela membrana, contudo, em bactérias este efluxo é a base da maioria dos sistemas de resistência aos metais tóxicos, envolvendo transportadores como as P- H^+ -ATPases ou transportadores do tipo antiporte (Silver e Ji, 1994; Silver, 1996). Em plantas foram encontradas diversas classes de transportadores de metal, como as CPx-ATPases, Nramps e as da família CDF (facilitador de difusão de cátions) e ZIP, as quais estão envolvidas na absorção de metais e homeostase em geral, desempenhando um papel chave na tolerância a estes elementos (Williams et al., 2000; Guerinot, 2000).

Uma vez dentro da célula, a quelação dos metais por ligantes de alta afinidade, como exemplo, os aminoácidos, ácidos orgânicos e duas classes de peptídeos, as fitoquelatinas e as metalotioneínas, pode ocorrer. Em seguida um segundo sistema de defesa entra em ação, a compartimentalização vacuolar, em que o complexo metal-quelante é transportado e acumulado no vacúolo através de um co-transporte do tipo antiporte Metal/ H^+ , cuja energia é proveniente do gradiente eletroquímico gerado pelas V- H^+ -ATPases, promovendo, então, a redução da concentração dos íons tóxicos no citoplasma, mantendo a homeostase celular e prevenindo danos à fisiologia e bioquímica dos processos celulares (Rauser, 1999; Clemens, 2001).

Em plantas tolerantes especula-se que os sistemas de transporte do tonoplasto sejam resistentes a estes metais tóxicos uma vez que esta organela exerce vários papéis chave no metabolismo vegetal. Um grande número de

enzimas está presente no vacúolo como as proteases, ribonucleases, e outras hidrolases ácidas, o que lhe confere o caráter de organela lítica da célula vegetal, degradando e reciclando compostos durante a senescência ou na morte celular programada (Taiz, 1992).

2.3. Toxicidade do Alumínio

A contaminação por metais no ambiente pode originar-se de processos naturais, através da decomposição de rochas metalíferas, ou de atividades industriais e agrícolas, as quais têm sido cogitadas como a principal razão do aumento crescente da concentração dos metais no solo (Bellion et al., 2006). O impacto do excesso dos metais nos ecossistemas tem sido bastante discutido pela possibilidade da contaminação da cadeia alimentar animal e humana (Tavares e Carvalho, 1992).

Dentre os metais contaminantes do solo, o alumínio (Al) é o mais abundante e o terceiro elemento mais comum na crosta da Terra, podendo ser encontrado na forma de aluminossilicatos insolúveis ou óxidos (Kochian, 1995). Sua toxicidade é considerada um dos maiores problemas em solos ácidos com $\text{pH} \leq 5$, uma vez que provoca a limitação do crescimento das plantas (Delhaize e Ryan, 1995). Isso ocorre, pois em baixo pH o H^+ atua sobre os minerais liberando Al^{3+} na forma de $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, o qual é comprovadamente tóxico, sendo que, à medida que o pH aumenta o $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ sofre sucessivas desprotonações formando o $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ e o $\text{Al}(\text{OH})_3$; chegando em pH neutro o alumínio ocorre na forma de $\text{Al}(\text{OH})_3$ mais conhecido como gipsita, sendo relativamente insolúvel e quando, finalmente, o pH da solução aumenta para valores próximos a 7,4 o íon alumínio $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ prevalece (Kinraide, 1991).

De acordo com Alves (1997), estudando espécies florestais, o Al acumula-se preferencialmente no sistema radicular das plantas, retardando o seu crescimento e desenvolvimento, e só depois é translocado para a parte aérea, resultando em menor produção da matéria seca das raízes, deficiência mineral e estresse hídrico.

Os cátions de Al^{3+} , por serem ligantes metálicos com preferência por doadores de oxigênio (Zhang e Taylor, 1991), comumente ligam-se a compostos inorgânicos como F^- , PO_4^{3-} , e SO_4^{2-} , e orgânicos como ácidos orgânicos, proteínas e lipídios (Delhaize e Ryan, 1995), causando assim diversos efeitos deletérios nos vegetais como: inibição da divisão celular, lesões na membrana, modificações na síntese de DNA e mitose, alteração na rigidez da parede celular (Foy et al., 1978; Vázquez et al., 1999) e diminuição na absorção de Ca, P, Mg, K e Fe que leva à desregulação do metabolismo celular, diminuindo a respiração radicular, provocando alterações morfológicas na parte aérea (escurecimento, formação de calos e brotações rígidas) e reduzindo as proteínas solúveis totais (Basso et al., 2003).

A toxidez por alumínio também está relacionada a mudanças nas propriedades da membrana plasmática (Delhaize e Ryan, 1995). Este metal provoca a despolarização da membrana tornando as plantas mais vulneráveis à sua toxidez (Sivaguru et al., 1999; Ahn et al., 2001). Neste processo o envolvimento das H^+ -ATPases de membrana plasmática é essencial, uma vez que a despolarização do potencial de membrana de plantas tratadas com alumínio, está associada a uma queda na atividade das H^+ -ATPases e consequente dissipação do gradiente de H^+ (Façanha e De Meis, 1995; Ahn et al., 2001).

Posteriormente, foi demonstrado que o Al poderia também provocar um aumento da atividade das H^+ -ATPases em uma variedade de milho tolerante ao Al (Façanha e Okorokova-Façanha, 2002). Esta ativação da bomba de H^+ induzida por Al foi comprovada não só em plantas, como em trigo e soja (Ahn et al., 2004; Shen et al., 2005), mas também em fungos como na levedura *Yarrowia lipolytica* (Lobão et al., 2007). Tal efeito foi correlacionado a uma maior secreção de ácidos orgânicos como o malato e o citrato, que dependeria da ativação do gradiente eletroquímico de H^+ para potencializar seus próprios transportadores secundários, aumentando sua capacidade de transporte para o apoplasto onde podem atuar como quelantes de metais (Ahn et al., 2004; Shen et al., 2005). Este mecanismo foi refinado com novas evidências mostrando que o alumínio regula independentemente as atividades de transporte de ácidos orgânicos e das H^+ -ATPases, tanto em nível transcricional, como traducional e pós-traducional, sendo

as modificações pós-translacionais estando mais associadas com mudanças na atividade da H⁺-ATPase e não na quantidade desta enzima (Yang et al., 2011).

Apesar das evidências apontarem para um mecanismo semelhante de ativação das H⁺-ATPases por Al operar em leveduras (Lobão et al., 2007), faltam estudos que estendam esta descoberta a outros fungos, principalmente aos que interagem simbioticamente com as plantas, contribuindo para sua sobrevivência em condições variadas de estresses ambientais. Neste contexto, a associação de fungos ectomicorrízicos com plantas tem merecido destaque como uma alternativa promissora para evitar os efeitos negativos do alumínio nos vegetais, uma vez que as ectomicorrizas possuem diversos mecanismos de detoxificação de metais pesados. Hentschel et al. (1993) e Kieliszewska-Rokicka et al. (1998) estudando os efeitos do alumínio nos vegetais, relataram uma menor concentração de alumínio e maior peso seco da parte aérea em *Picea abies* micorrizada com *Paxillus involutus* e *Pinus silvestris* L. micorrizado com *Suillus luteus*, quando comparadas às plantas não micorrizadas.

2.4. Os Pigmentos Melânicos

As melaninas consistem em um grupo de substâncias, com propriedades similares, de cor tipicamente marrom-escura ou preta (Butler e Day, 1998). São estruturalmente complexas, formadas pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos e indólicos, insolúveis em solventes aquosos ou orgânicos devido ao seu alto peso molecular e à heterogeneidade, o que também tem dificultado a descrição de uma identidade química estruturalmente bem-definida (Jacobson, 2000; Langfelder et al., 2003).

Este pigmento é amplamente encontrado na natureza, sendo produzido por plantas, animais, protozoários e microrganismos (Butler e Day, 1998). A diferença básica entre a melanina dos animais e a melanina dos fungos é que a primeira é sintetizada e mantida quase totalmente como grânulos em células especializadas, os melanócitos (Riley, 1997). A segunda, porém, pode ser encontrada na parede celular ou pode ser secretada no meio extracelular na forma de polímeros (Bell e Wheeler, 1986).

As melaninas extracelulares são aquelas cuja síntese ocorre totalmente independente da parede celular e podem ser sintetizadas de duas formas: fenóis oxidases podem ser secretados no meio extracelular para oxidar compostos fenólicos de diversas origens, ou então, compostos fenólicos são secretados no meio extracelular para depois serem auto-oxidados ou oxidados mais tarde por enzimas liberadas pelo fungo (Wheeler et al., 1978; Butler e Day, 1998).

Existem três tipos de classificação para este pigmento: as eumelaninas, de cor marrom-escura ou preta, são formadas por um processo de polimerização complexo que envolve quinonas e radicais livres; as feomelaninas, de cor vermelha ou amarela, são derivadas da tirosina e cisteína; e as alomelaninas que são formadas a partir de precursores de nitrogênio livre (Riley, 1997; Hamilton e Gomez, 2002).

Em relação às vias biossintéticas da melanina existem diversos precursores identificados. Entre eles está o 1,8-dihidroxinaphtaleno (DHN), o qual é sintetizado, por ascomycetos e deuteromycetos, a partir de pentaquetídeoase foi descoberto usando mutantes de *Verticillium dahliae* deficientes em melanina (Bell et al., 1976; Puhalla, 1975). Inicialmente o acetato é convertido em 1,3,6,8-THN, para subsequentemente ser transformado em scytalone, depois em 1,3,8-THN, vermelone e finalmente em DHN, o qual dará origem à DHN-melanina. As enzimas redutase e desidratase são únicas desta via e podem ser inibidas pelo composto triciclazol (Bell e Wheeler, 1986).

O composto L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) origina as DOPA-melaninas. Sua biossíntese inicia-se pela transformação da L-tirosina em L-DOPA e depois em o-Dopaquinona, tais reações são catalisadas pela enzima tirosinase. Em seguida ocorre uma rápida ciclização e a o-Dopaquinona é modificada em leucodopacromo, o qual é alterado em dopacromo que sofre reações de polimerização resultando na formação da DOPA-melanina (Faria, 2008).

A enzima tirosinase possui interesse econômico sendo amplamente utilizada em processos industriais e medicinais (Berliner et al., 1993; D'Mato e Robert, 2003) e pode ser inibida por diversas substâncias fúngicas, vegetais ou sintéticas (Faria, 2008). Nesta via biossintética também pode ocorrer a atuação da enzima laccase, a qual é sintetizada extra e intracelularmente e tem sido muito estudada (Ikeda et al., 2002; Nagai et al., 2003). Este tipo de melanina é

comumente encontrado em basidiomicetos, tanto na parede celular como no meio extracelular (Fogarty e Tobin, 1996).

O γ -glutamil-4-hidroxibenzeno (GHB) e o γ -glutaminil-3,4-dihidroxibenzeno (GDHB) podem ser sintetizados por fungos do filo Basidiomycota (Miranda et al., 1992; Faria, 2004). O ácido shikímico é o precursor do GHB, que sofre uma *o*-hidroxilação, seguido por uma desidrogenação do difenol e polimerização do γ -glutaminil-3,4-benzoquinona (GBQ). A metade γ -glutaminil do GHB pode ser removida antes da polimerização, assim o resíduo γ -glutaminil pode ser transferido para um receptor, liberando o 4-aminofenol que pode ser convertido em vários intermediários, como o 2-hidroxi-4-iminoquinona. Esses intermediários serão, então, polimerizados para formar a GHB-melanina (Fogarty e Tobin, 1996). O GHB ocorre no micélio, no corpo de frutificação do fungo e nos esporos, já o GDHB ocorre apenas nas hifas (Rast et al., 1981; Stussi e Rast, 1981).

O catecol é, também, um provável precursor da melanina (Bell e Wheeler, 1986), encontrado a partir da degradação deste pigmento isolado de esporos do fungo parasita *Ustilago maydis* (Piatelli et al., 1965). Tal composto também foi encontrado em extratos etanólicos destes esporos (Bell e Wheeler, 1986). A origem biossintética do catecol é ainda desconhecida, porém supõe-se que ele possa ser originado a partir da via do ácido shikímico (Fogarty e Tobin, 1996).

Fatores ambientais e nutricionais podem influenciar a produção de melanina, e um dos mais importantes é a glicose que, de acordo com diversos autores, pode estimular a produção deste pigmento. Rowley e Pirt, (1972) relataram que a falta de glicose estimula a produção de melanina no fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*. Assim como Nurudeen e Ahearn, (1979) constataram que o aumento da concentração de glicose reduziu a pigmentação de todos os serótipos do fungo *Filobasidiella*. A disponibilidade de nutrientes limitando a produção de tal pigmento também foi constatada no fungo ectomicorrízico *Lentinula boryana* (Faria, 2004). Assim, a melanina pode ser caracterizada como um metabólito secundário, pois começa a ser produzida quando a fonte de carbono do fungo se esgota (Pirt e Rowley, 1969). Entretanto, outro aspecto relatado foi o fato de que a restrição da taxa metabólica do fungo

Aspergillus nidulans limitou a síntese de melanina, exercendo um controle maior do que a falta de nutrientes (Rowley e Pirt, 1972).

A disponibilidade de oxigênio também é um fator que influencia a produção de melanina, pois ele faz parte de algumas etapas do processo de síntese deste pigmento (Faria, 2004). Variações térmicas também podem influenciar a produção de melanina, pelo menos dois trabalhos descreveram estímulos da produção de melanina sob condições de altas temperaturas em actinomicetos (Filippova et al., 1987) e na ectomicorriza *Lentinula boryana* (Faria, 2004).

Outros trabalhos também sugeriram que o acúmulo de melanina também pode fornecer uma proteção contra o calor, o frio ou a dessecação em alguns fungos (Rosas e Casadevall, 1997; Howard e Valent, 1996; Rehnstrom e Free, 1997).

De fato, tem se tornado cada vez mais evidente que a capacidade de produzir melanina confere vantagens adaptativas aos organismos que a possui, consistindo em uma importante barreira aos efeitos deletérios de vários estresses ambientais (Henson et al., 1999). A proteção contra a radiação UV tem sido a vantagem proporcionada pela melanina mais amplamente estudada em humanos, mas que também foi evidenciada em diversos fungos como, *Sporothrix schenckii* (Romero-Martinez et al., 2000), *Aspergillus niger* (Singaravelan et al., 2008), *Cladosporium* sp. (Saleh et al., 1988), *Phaeococcomyces* sp. (Butler and Day, 1998), e foi comprovada como uma das vantagens proporcionadas pela melanina. Tal proteção ocorre, pois a melanina tem a capacidade de absorver uma ampla faixa de espectros eletromagnéticos, sendo que o grau de resistência à radiação está associado à quantidade de melanina produzida (Nosanchuck e Casadevall, 2003).

Alguns fungos demonstraram a capacidade de produzir este pigmento quando em contato com outros fungos em ágar (White e Boddy, 1992). Esta melanização, em resposta ao que pode ser considerado um estresse biótico, serve como uma prevenção contra a lise enzimática ou mesmo autólise (Frederick et al., 1999). O mecanismo de ação da resistência da melanina a enzimas hidrolíticas ainda não foi completamente elucidado, mas alguns estudos têm sugerido mecanismos que podem envolver indução pela melanina das interligações entre polissacarídeos da parede celular e/ou impedimentos estéricos

pela melanina acumulada nos espaços existentes na rede de polissacarídeos da parede celular (Butler e Day, 1998, Jacobson, 2000).

A produção de pigmentos extracelulares como melaninas tem sido considerada o principal mecanismo de precipitação extracelular de metais pesados. Grazziotti et al., (2001) demonstraram que um isolado de *Pisolithus tinctorius* teve sua produção de pigmentos extracelulares aumentada com a adição de solo contaminado com Zn, Cu, Cd e Pb ao meio de cultura, e esta produção foi máxima na mistura próxima àquela em que ocorreu a produção máxima de micélio. Diversos grupos funcionais presentes na melanina como, grupos carboxílicos, hidroxila fenólicos, aminas e quinonas, podem contribuir para a ligação desta aos metais, resultando em um conjunto de múltiplos sítios de ligação (Saiz-Jiminez e Shafizadeh, 1984; Sakaguchi e Nakajima, 1987).

Grande parte das funções citadas anteriormente para a melanina foi relatada principalmente em fungos patogênicos, sendo que nestes outro papel da melanina tem se destacado, o qual diz respeito ao poder de virulência deste pigmento. Vários estudos têm relatado que somente apressórios melanizados dos fungos patogênicos *Pyricularia oryzae*, *Magnaporthe grisea*, *Colletotrichum lagenarium* e *Gaeumannomyces graminis* são capazes de penetrar na célula hospedeira (Wheeler e Bell, 1988; Butler e Day, 1998).

As respostas imunes às infecções fúngicas incluem: produção de citocinas como o interferon-gama (INF- γ), interleucina (IL-12) e fator de necrose tumoral (TNF), além de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, principalmente peróxido de hidrogênio e o óxido nítrico (Shoham e Levitz, 2005). Foi observado que uma cepa de *C. neoformans*, que produz grandes quantidades de melanina, inibe a produção do Fator- α de necrose tumoral e a linfoproliferação em um modelo de infecção murina (Huffnagle et al., 1995). Além disso, uma infecção intracerebral de rato de uma cepa albina de *C. neoformans* resultou em dano mínimo de tecido e induziu IL-12, IL-1b e TNF- α enquanto uma cepa melanótica causou extenso dano e inibiu a resposta de citocinas (Barluzzi et al., 2000). Estes pigmentos também promovem resistência a drogas antifúngicas como a anfotericina B, tornando-as assim, um alvo para o desenvolvimento de novas drogas com maior eficácia no tratamento contra doenças causadas por fungos patogênicos (Wang e Casadevall, 1994).

As melaninas fúngicas parecem ser similares aos ácidos húmicos de solos em relação às suas propriedades químicas e físico-químicas como, por exemplo, seu comportamento em solventes, composição elementar, UV e espectro visível, capacidade de troca de íons, compostos voláteis liberados sobre pirólise, aminoácidos liberados em hidrólise ácida, entre outros (Volnova e Mirchink, 1972; Zaprometova et al., 1971). Assim como as melaninas, os ácidos húmicos possuem grupos carboxílicos capazes de se ligar a metais pesados no solo, através da troca de íons com a liberação de H^+ (Boyd et al., 1981).

Tem sido sugerido que as melaninas produzidas por fungos de solo formam as frações mais estáveis dos ácidos húmicos, porém, para que isto ocorra seria necessário que as taxas de decomposição das melaninas fossem comparáveis às dos ácidos húmicos (Zviagintsev e Mirchink, 1986). Para testar tal hipótese, Zavgorodnyaya et al., (2002) realizaram um estudo comparando as propriedades de biodegradação das melaninas dos fungos *Aspergillus niger* e *Cladosporium cladosporioides* com as de ácidos húmicos de solos e lignito e concluíram que para a melanina contribuir para a fração orgânica estável do solo, ela teria que passar por diversas modificações químicas afetando drasticamente as suas propriedades.

Tem sido proposta a atividade dos ácidos húmicos no estímulo do crescimento das raízes de uma maneira semelhante à promovida pela auxina, através da teoria do crescimento ácido (e.g., Façanha et al., 2002; Dobbs et al., 2007; Canellas et al., 2008). Os primeiros trabalhos que deram base a esta teoria foram propostos por Hager et al., (1971) e Rayle e Cleland (1972) quando sugeriram que a auxina ativa as ATPases de membrana plasmática acompanhada da transferência de prótons para o meio extracelular e que a expansão celular pode ser induzida pela ação das auxinas, através da estimulação de enzimas responsáveis pela clivagem da parede celular ou do estímulo da liberação de íons hidrogênio, os quais estariam hidrolisando ligações ácido-lábeis da parede celular.

Um grande avanço frente à hipótese do crescimento ácido ocorreu a partir da descoberta de uma classe de proteínas, nomeadas de expansinas, as quais pareciam ter ação proteolítica sobre a parede celular (Mc-Queen Mason, et al., 1992). Contudo, outro modelo tem sido proposto para a ação das expansinas, baseado no enfraquecimento das ligações covalentes entre os polissacarídeos da

parede celular, tornando os glucanos localizados na superfície da microfibrilas, mais acessíveis à hidrólise enzimática das celulases, promovendo o afrouxamento da parede celular (Cosgrove, 2000).

Foi concluído que a auxina estimula a extrusão de prótons através das H⁺-ATPases de membrana plasmática (Rayle e Cleland, 1992) e promove também a síntese de novas P-H⁺-ATPases, garantindo a manutenção do potencial de membrana, do transporte ativo de solutos e do turgor celular (Hager et al., 1991; Frías et al., 1996). Mais recentemente foi relatado o mecanismo pelo qual a auxina promove a ativação das ATPases, sendo este através da fosforilação da penúltima treonina presente na região C-terminal destas enzimas (Takahashi et al., 2012). Estas enzimas, então, passam a bombear mais prótons para o meio extracelular, levando a uma acidificação do apoplasto. Tal acidificação promove a ativação das expansinas, cuja ação foi explicada anteriormente, e a absorção de nutrientes como o K⁺ através de transportadores antiportes e canais de cátions (Tode e Luthen, 2001). Por fim, o afrouxamento da parede celular permite a entrada de água, aumentando a pressão de turgor no interior da célula (a qual se mantém constante devido à absorção de nutrientes) necessária à expansão celular (Rea e Sanders, 1987; Maeshima et al., 1996). Dada as similaridades estruturais e funcionais já descritas entre melaninas e ácidos húmicos, torna-se tentador investigar se uma ação similar provocada pelos AH sobre as H⁺-ATPases e sobre o crescimento celular vegetal poderia ser também induzida pela melanina.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Analisar as respostas das bombas de H⁺ nos mecanismos de adaptação ao Al na interação micorrízica *Pisolithus microcarpus-Eucalyptus urograndis* e o papel da melanina nestes processos.

3.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar microscopicamente as estruturas existentes nas hifas do *P. microcarpus*;
- Caracterizar os pigmentos melânicos produzidos pelo fungo ectomicorrízico *P. microcarpus*;
- Relatar a influência do Al no crescimento do micélio fúngico;

- Avaliar o efeito do Al na modulação das bombas de H⁺ isoladas do *P. microcarpus* e das raízes de *E. urograndis* inoculadas ou não com o fungo micorrízico;
- Analisar o efeito da melanina sobre a ação do alumínio na regulação das H⁺-ATPases de membrana plasmática e vacuolar em frações de microsossomos isoladas de raízes de *E. urograndis*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Preparo de Meio de Cultura Para Crescimento do Fungo

Para o preparo do meio MNM - Merlin Norkrans Modificado (Marx, 1969) foram adicionados os seguintes reagentes para 1L de meio: CaCl_2 ($0,05 \text{ g L}^{-1}$), NaCl ($0,025 \text{ g L}^{-1}$), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ($0,15 \text{ g L}^{-1}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,15 \text{ g L}^{-1}$), FeCl_3 (1 g L^{-1}), 4mL de KH_2PO_4 ($0,125 \text{ g L}^{-1}$), Tiamina ($25 \mu\text{g L}^{-1}$), 15g de agar-ágar, 10 g de glicose, 2 g de peptona, 0,5 g de extrato de levedura e tampão MES 0,5 M. Em seguida o pH foi ajustado para 5,5-5,6. Após autoclavagem a 121° C por 30 minutos, foram vertidos 20 mL de meio em placas de Petri (10 x 100 mm) em câmara de fluxo laminar vertical.

4.2. Obtenção e Multiplicação do Fungo

O isolado fúngico ectomicorrízico PT24 (*Pisolithus microcarpus*) foi obtido da coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Culturas dos isolados foram mantidas em meio de cultura sólido MNM. No preparo das placas foram

adicionados 20 mL de meio de cultura em placas de Petri (10 x 100 mm), as quais foram incubadas na ausência de luz, à temperatura de $22\pm 1^\circ\text{C}$ em incubadora BOD. Transferências quinzenais para meio fresco de igual composição foram realizadas.

4.3. Cultivo do Fungo em Meio Líquido

O meio de cultura utilizado foi o MNM, anteriormente descrito no item 4.1, porém com a quantidade triplicada de tiamina ($75 \mu\text{g L}^{-1}$). Em frascos erlenmeyer de 250 mL, contendo 150 mL de meio, foram colocados 10 discos de meio com micélio de culturas jovens e ausentes de contaminações, com 11 mm de diâmetro, em câmara de fluxo laminar vertical. As culturas foram mantidas em incubação a 23°C e 110 rpm em incubadora shaker, por 25 dias.

4.4. Extração do Pigmento Fúngico

O micélio de *P. microcarpus* foi cultivado em meio MNM líquido como descrito no item 4.3. O micélio foi separado do meio utilizando-se uma peneira. Extraíu-se o micélio a quente (70°C) com solução de NaOH 0,1 M por 3h em banho-maria, em seguida o micélio restante foi separado do meio filtração em papel filtro. A precipitação do pigmento foi feita com adição de HCl até pH 3 e o precipitado foi separado do sobrenadante por centrifugação (4000 g, 10 min). Este precipitado foi dissolvido em NaOH (1M), para cada 1mL de solução de NaOH foram adicionados 4 mL de água desionizada. O pigmento então foi precipitado novamente com HCl e retirado por centrifugação. Este processo foi repetido por mais três vezes e o pigmento foi submetido à diálise para remoção dos sais e em seguida seco por liofilização (adaptado de Della-Cioppa et al., 1998).

4.5. Caracterização Espectrográfica (Infravermelho com Transformada de Fourier) do Pigmento Fúngico

Para a análise de infravermelho pesou-se 1 mg das amostras a serem analisadas e adicionou-se 100 mg de KBr. Foram feitas pastilhas destas misturas em pastilhadora com 8 toneladas por cm^2 de pressão, as quais foram analisadas em espectrômetro IR Prestige-21 (Shimadzu, Tokio, Japão) equipado com um acessório de refletância difusa, acumulando até 100 scan com uma resolução de 4 cm^{-1} .

4.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão

O micélio do *P. microcarpus* foi fixado em uma solução de glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4,0% e tampão fosfato 0,05 M em pH 7,2, por 2h. Em seguida foram feitas três lavagens de 30 min em tampão fosfato 0,05 M. Posteriormente, os fragmentos foram desidratados em uma série alcoólica crescente (30, 50, 70, 90 e 2 vezes 100%), durante 1h30min. Finalmente foi feita a inclusão em resina LR White e polimerização em estufa 50°C .

4.7. Especificação do Meio MNM

Realizou-se a especificação iônica de nutrientes e do metal alumínio em meio MNM, através do programa Visual MINTEQ versão 2.53. Com estas análises estimou-se com uma maior precisão a biodisponibilidade dos nutrientes e do metal presente no meio de crescimento do fungo ectomicorrízico. Foi necessário reduzir a concentração de fosfato e ferro, além de alterar o pH do meio para 4,5, afim de obter uma maior porcentagem de biodisponibilidade dos nutrientes e do metal no meio de cultura sólido MNM.

4.8. Experimento com Alumínio em Placas de Petri

Micélios de 11 mm de diâmetro foram retirados das extremidades de culturas puras com 20 dias de idade e transferidos para novas placas de Petri (um disco centralizado na placa de Petri) contendo 25 mL de meio MNM especiado para as doses de metal: 0, 50, 100, 200, 500 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ AlCl_3 . Foi adicionada uma baixa concentração de tampão MES 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, de forma a remover os efeitos das variações no pH do meio como uma variável adicional assim mascarando os resultados. O pH do meio MNM foi ajustado para 4,5. O crescimento micelial radial foi medido com auxílio de um paquímetro digital, durante 20 dias de crescimento.

4.9. Ensaio com o Fungo *Pisolithus microcarpus* em Meio Contendo Alumínio *In vivo*

Em frascos erlenmeyer de 250 mL, contendo 150 mL de água destilada, KCl, CaCl_2 e alumínio nas doses 0, 10, 50 e 100 μM na forma de AlCl_3 , foram colocados em média 10 g de micélio de culturas jovens e ausentes de contaminações do fungo *P. microcarpus*, em câmara de fluxo laminar vertical. O fungo foi incubado a 23°C por 5 min, separado do meio com o auxílio de uma peneira e lavado com água deionizada para isolamento das H^+ -ATPases de membrana plasmática e vacuolar.

4.10. Obtenção da Fração Microssomal das Hifas Fúngicas

A fração microssomal foi isolada por meio de uma adaptação da técnica descrita por Giannini e Briskin (1987). As hifas fúngicas foram homogeneizadas em liquidificador com tampão de extração composto de sacarose 250 mM, glicerol a 10 %, DTT 5 mM, EDTA 5 mM, PVP- 40 0,4 %, KCl 100 mM, BSA 0,3 %, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM, Tris-HCl pH 8,0 100 mM, na relação peso de

tecido/volume de tampão de 1:2. As soluções usadas na preparação estavam geladas e toda a manipulação foi realizada na temperatura entre 0 e 4°C. O homogenato resultante foi então filtrado e submetido à centrifugação a 3.000 g, durante dez minutos. O sobrenadante foi submetido à nova centrifugação, agora a 100.000 g, por 45 min. O precipitado da última centrifugação foi solubilizado em solução-tampão com glicerol a 15 %, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM, Hepes-KOH 10 mM pH 7,6 e EDTA 1 mM. As amostras foram armazenadas em tubos criogênicos em freezer a -70°C até as análises das atividades ATPásicas.

4.11. Atividade da Hidrólise de ATP *In vivo* e *In vitro* das Hifas Fúngicas

Após a extração da fração microsomal das hifas fúngicas do experimento em meio contendo alumínio *in vivo* (itens 4.9 e 4.10), foi realizada a mensuração da atividade enzimática da P-H⁺-ATPase e da V-H⁺-ATPase. O meio de reação continha Tris-Hepes 50 mM pH 6,5 (para membrana plasmática), 7,0 (para membrana vacuolar), MgSO₄ 1mM, KCl 100mM, NaMoO₄ 0,2mM, ATP 1mM. Para medição da atividade referente a cada tipo de ATPase estudada foram usados inibidores específicos, para a P-H⁺-ATPase (vanadato 0,2mM) e para V- H⁺-ATPase (nitrito 100mM). A reação foi iniciada com a adição de membranas (na concentração de 0,06 mg mL⁻¹ de proteína) e parada após 0, 10, 20, 30, 40 e 50 minutos de incubação, pela retirada de alíquotas que foram imediatamente transferidas para tubos de ensaio contendo TCA a 5%, mantidos em gelo. Para revelar o fosfato liberado pela hidrólise de ATP, foi empregado o método de Fiske e Subbarow (1925), e a leitura foi feita no leitor de placas a 750 nm.

As membranas isoladas das hifas fúngicas do tratamento controle, foram utilizadas para analisar o efeito do Al *in vitro* na atividade das bombas protônicas (P-H⁺-ATPase e da V-H⁺-ATPase) das hifas de *P. microcarpus*. Para tal adicionou-se 0, 10, 50, 100, 200, 500 e 1000µM de AlCl₃ ao meio de reação e, então, foi iniciada a reação de hidrólise do ATP com a adição de membranas (na concentração de 0,06 mg mL⁻¹ de proteína) e parada após 40 min com a adição de TCA a 5%, mantido em gelo. Para revelar o fosfato liberado pela hidrólise de

ATP, foi empregado o método de Fiske e Subbarow (1925), e a leitura foi feita no leitor de placas a 750 nm.

A proteína total contida na preparação foi dosada pelo método clássico descrito por Bradford (1976) utilizando BSA como proteína padrão.

4.12. Plantio de *Eucalyptus urograndis*

As sementes de *Eucalyptus grandis*, obtidas no Departamento de Sivilcultura da Universidade Federal de Viçosa, foram desinfestadas com hipoclorito de sódio 2,5% por 5 min, álcool etílico 70% por 2 min, lavadas 3x em água deionizada, embebidas durante 5min em água corrente, e plantadas em uma bandeja de plástico contendo apenas areia esterilizada. As plântulas foram regadas com solução de Clark diluída (1/4F) (Tabela 1), três vezes por semana.

Após 30 dias de crescimento foi realizado o plantio e inoculação em substrato areia, devidamente autoclavado, e distribuídos em vasos de 500 mL. Plântulas de Eucalipto, selecionadas e uniformizadas por tamanho, foram inoculadas com o fungo ectomicorrízico *P. microcarpus*, de acordo com o método sanduíche, em que cinco discos de 11 mm de diâmetro de culturas puras do *Pisolithus microcarpus* foram colocados ao redor das raízes de Eucalipto no momento do plantio. As plantas foram regadas com água e solução nutritiva de Clark diluída (1/4F), três vezes por semana durante 60 dias. O experimento foi montado no delineamento experimental inteiramente casualizado e consistiu de dois tratamentos microbiológicos (inoculado e não inoculado), três doses de metal e quatro repetições. Após os 60 dias de crescimento, as plantas foram regadas com solução de metal, pH 4,5, contendo as doses de 0, 200 e 1000 μM AlCl_3 , durante cinco dias. Posteriormente foi realizado o isolamento das H^+ -ATPases de membrana plasmática, vacuolar e mitocondrial.

Tabela 1. Solução modificada de Clark utilizada nos experimentos com micorrizas.

Composição Química	Concentração Estoque	Concentração Final	Quantidade a adicionar
	Macronutrientes ^a		
	-----M-----	-----mM-----	-----ml L ⁻¹ -----
NaH ₂ PO ₄	0,037	0,056	0,5
MgSO ₄	1	0,6	0,6
NH ₄ NO ₃	1	0,9	0,9
KCL	1	0,5	0,5
KNO ₃	1	1,3	1,3
Ca(NO ₃) ₂	1	2,53	2,53
Sol. Micronutrientes			1 mL
Sol. Fe-EDTA			1 mL
MES*(optativo)	50 mM	0,05 mM	1 mL
	Micronutrientes ^b		
	-----mM-----	-----µM-----	-----ml L ⁻¹ -----
Micronutrientes	-	-	1,00
H ₃ BO ₃	13,3	13,3	-
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	7	7	-
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	2	2	-
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,5	0,5	-
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,086	0,086	-
Na ₂ FeEDTA ^c	82,35	-	1,00

^a Soluções de macronutrientes independentes; ^b Solução contendo todos os micronutrientes (exceto Ferro); ^c Solução de Fe-EDTA independente, adicionada por último.

4.13. Obtenção da Fração Microssomal de Raízes de *Eucalyptus urograndis*

A fração microssomal foi isolada por meio de centrifugação diferencial (Giannini e Briskin, 1987). As raízes foram cortadas, pesadas e homogeneizadas em meio tamponado, usando grau e pistilo. O tampão de extração foi composto de sacarose 250 mM, glicerol a 10 %, DTT 5 mM, EDTA 5 mM, PVP- 40 0,4 %, e

KCl 100 mM, BSA 0,3 %, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM, Tris-HCl pH 8,0 100 mM, na relação peso de tecido/volume de tampão de 1:2. Toda a manipulação foi realizada na temperatura entre 0 e 4°C. O homogenato resultante foi então filtrado e submetido à centrifugação a 3.000 g, durante dez minutos. Para o isolamento das mitocôndrias, o sobrenadante foi novamente centrifugado a 10.000 g, por mais 15 min. O sobrenadante foi submetido à nova centrifugação, agora a 100.000 g, por 45 min. O precipitado dessa última centrifugação foi solubilizado em solução-tampão com glicerol a 15 %, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM, Hepes-KOH 10 mM pH 7,6 e EDTA 1. As amostras foram armazenadas em tubos criogênicos em freezer a -70°C até as análises das atividades ATPásicas.

4.14. Atividade da Hidrólise de ATP das ATPases do tipo P, V, F e H⁺-PPase

Para mensuração da atividade enzimática foram utilizadas as frações mitocondriais para atividade da F1F0-ATPase e a fração microsomal para atividade da P-H⁺-ATPase, V- H⁺-ATPase e H⁺-PPase. Para tal o meio de reação continha Tris-Hepes 50 mM pH 6,5 (para membrana plasmática), 7,0 (para membrana vacuolar) e 8,0 (para membrana mitocondrial), MgSO₄ 1 mM, KCl 100 mM, NaMoO₄ 0,2 mM, ATP ou PPI 1 mM. Para medição da atividade referente a cada tipo de ATPase estudada foram usados inibidores específicos, para a F1F0-ATPase (azida 5 mM), P-H⁺-ATPase (vanadato 0,2 mM), V- H⁺-ATPase (nitrato 100 mM). A hidrólise de PPI foi aferida através de sua dependência por K⁺. A reação foi iniciada com a adição de cada fração de membranas (plasmalema ou mitocôndria; na concentração de 0,06 mg mL⁻¹ de proteína) e parada após 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos de incubação, pela retirada de alíquotas que foram imediatamente transferidas para tubos de ensaio contendo TCA a 5%, mantidos em gelo. Para revelar o fosfato liberado pela hidrólise de ATP, foi empregado o método de Fiske e Subbarow (1925), e a leitura foi feita no leitor de placas a 750 nm.

As membranas isoladas das raízes de *Eucalyptus urograndis* do tratamento controle foram utilizadas para analisar o efeito do Al *in vitro* na atividade das bombas protônicas (P-H⁺-ATPase, V-H⁺-ATPase, F1F0-ATPase e H⁺-PPase).

Para tal adicionou-se 0, 5, 20, 50 μM de AlCl_3 ao meio de reação e, então, foi iniciada a reação de hidrólise do ATP com a adição de membranas (na concentração de $0,06 \text{ mg mL}^{-1}$ de proteína) e parada após 40 min com a adição de TCA a 5%, mantido em gelo. Para revelar o fosfato liberado pela hidrólise de ATP, foi empregado o método de Fiske e Subbarow (1925), e a leitura foi feita no leitor de placas a 750 nm.

A proteína total contida na preparação foi dosada pelo método clássico descrito por Bradford (1976) utilizando BSA como proteína padrão.

4.15. Ensaio Com Melanina e Alumínio *In vitro*

As membranas isoladas das raízes de *Eucalyptus urograndis* do tratamento controle foram utilizadas para analisar o efeito do Al e da melanina *in vitro* na atividade da P-H⁺-ATPase. Para tal incubou-se cloreto de alumínio na concentração de 0, 5 e $500 \mu\text{M}$ e melanina na concentração de 0 e 10 mg L^{-1} de carbono com as vesículas membranares por 5 min e então, foi iniciada a reação de hidrólise do ATP com a adição de membranas (na concentração de $0,06 \text{ mg mL}^{-1}$ de proteína) incubadas ou não com alumínio e melanina, e parada após 40 min com a adição de TCA a 5%, mantido em gelo. Para revelar o fosfato liberado pela hidrólise de ATP, foi empregado o método de Fiske e Subbarow (1925), e a leitura foi feita no leitor de placas a 750 nm.

A proteína total contida na preparação foi dosada pelo método clássico descrito por Bradford (1976) utilizando BSA como proteína padrão.

4.16. Análise dos Dados

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para testar as diferenças entre os diâmetros do crescimento micelial em meio sólido contendo alumínio. As médias foram comparadas através do teste de Tukey ($p > 0,05$). Nos demais experimentos o erro padrão foi utilizado para demonstrar a variação dos dados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão das Hifas Fúngicas

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (Figura 4) forneceram informações sobre o aspecto morfológico das hifas do *Pisolithus microcarpus*. Foi possível observar, de uma forma geral, hifas cortadas transversalmente e longitudinalmente com suas estruturas internas. Foram observadas também estruturas “vazias”, globulares ou ovais, sem nenhuma estrutura interna aparente, compatível com a presença de um sistema vacuolar bem-desenvolvido (Figura 4A,B). Estas organelas são comumente conhecidas pelo desempenho do seu papel na osmoregulação, controle da composição citoplasmática e armazenamento, sendo vistas apenas como uma organela individual isolada que acumula materiais pelos processos de transporte de membrana e pela fusão de vesículas provenientes de outras organelas (Boller e Wiemken, 1986).

Contudo, foi constatado inicialmente em leveduras, através de marcadores fluorescentes em células vivas, que em um determinado estágio do ciclo de vida desses organismos ocorre com controlada precisão um transporte intervacuolar (Weisman e Wickner, 1988). Posteriormente vacúolos de hifas vivas de *Pisolithus microcarpus* foram incubados com 6-carboxifluoresceína e analisados em

microscópio de fluorescência, tais imagens juntamente com micrografias eletrônicas de hifas do *P. microcarpus* possibilitaram a revelação de um sistema tubular e vacuolar móvel, pleomórfico e interativo, o qual desempenha um papel importante no transporte intracelular e bidirecional de nutrientes, principalmente de P e K (Shepherd et al., 1993 A; Shepherd et al., 1993 B; Ashford, 1998; Cole et al., 1998).

Nas hifas de *P. microcarpus* a melanina está presente como uma camada, subjacente à parede celular, circundando toda a célula (Figura 4C). Diversos fungos como *Magnaphorthe griseae*, *Gaeumannomyces graminis*, *Cryptococcus neofarmans* e *Colletotricum lagenarium* já foram caracterizados por possuírem melanina disposta abaixo ou dentro da parede celular, na forma de camada ao redor da célula (Howard e Valent, 1966; Frederick et al., 1999; Eisenman et al., 2005; Kubo e Furusawa, 1986). Em *S. schenckii*, *Aspergillus nidulans* e *Cladosporium cucumerinum* a melanina foi situada na superfície da parede celular na forma de depósitos granulares (Romero-Martinez et al., 2000; Butler et al., 2005). Estudos mostram que em *Fonsecae pedrosoi* a melanina se encontra parcialmente depositada na parede celular e em sua maioria este pigmento se encontra encapsulado em organelas citoplásmicas, assemelhando-se aos melanossomas de mamíferos (Alviano et al., 1991; Franzen et al., 2008). Desta maneira, pode-se notar que as melaninas fúngicas estão, em sua maioria, depositadas na parede celular destes organismos, o que corrobora com a descrição das funções mais conhecidas deste pigmento como sua atuação como uma barreira de proteção contra luz UV, ataque lítico, estresses ambientais e desempenho de um papel estrutural na parede celular (Butler et al., 2005).

A parede celular do *P. microcarpus* apresenta-se densa e formada por diversas camadas (Figura 4D). Esta estrutura é geralmente formada por açúcares, proteínas, quitina e cinzas, com destaque para os β -1,3 glucanos, presentes em grande quantidade nas extremidades das hifas (Santos, 2007). Análises imunocitoquímicas mostraram que a parede celular desta ectomicorriza apresenta uma camada interna translúcida a elétrons, limitada por camada elétron-densa, características também verificadas neste trabalho. A quitina e os demais glicanos estão localizados na camada transparente e as proteínas na camada mais externa da parede (Martin et al., 1999).

Em grande número e evidência estão os grânulos de polifosfato, os quais aparecem encapsulados em vesículas na forma de depósitos esféricos eletrodensos (Figura 4E,F). A ocorrência de polifosfatos em culturas puras do fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* foi constatada através da técnica de ressonância magnética nuclear do ^{31}P (Tillard et al., 1989; Ashford et al., 1994). Polifosfatos inorgânicos são polímeros lineares de ortofosfato conectados por ligações de alta energia, que possuem diversas funções biológicas servindo como um reservatório de Pi, uma fonte alternativa de ligações de alta energia e um tampão contra condições alcalinas e contra metais (Kornberg et al., 1999).

O efeito positivo da associação ectomicorrízica na nutrição de fosfato da planta hospedeira é bem conhecido. Estes fungos possuem a capacidade de exsudar enzimas líticas e ácidos orgânicos no solo, realizando a solubilização do Pi e hidrólise do P orgânico, sendo que o Pi é absorvido pelas hifas através de transportadores de alta afinidade e armazenados nos vacúolos na forma de polifosfatos (Jansa et al., 2011; Cairney, 2011). A atividade de fosfatases ácidas parece ser uma das consequências fisiológicas iniciais do reconhecimento do hospedeiro na associação ectomicorrízica (Gianinazzi-Pearson et al., 1986). Tais atividades foram relatadas em diversos sistemas fungo-planta, tanto na membrana plasmática quanto no vacúolo, com destaque para o *P. microcarpus*, o qual tem sido amplamente estudado neste aspecto (Lei et al., 1990; Gao et al., 2009; Alvarez et al., 2011).

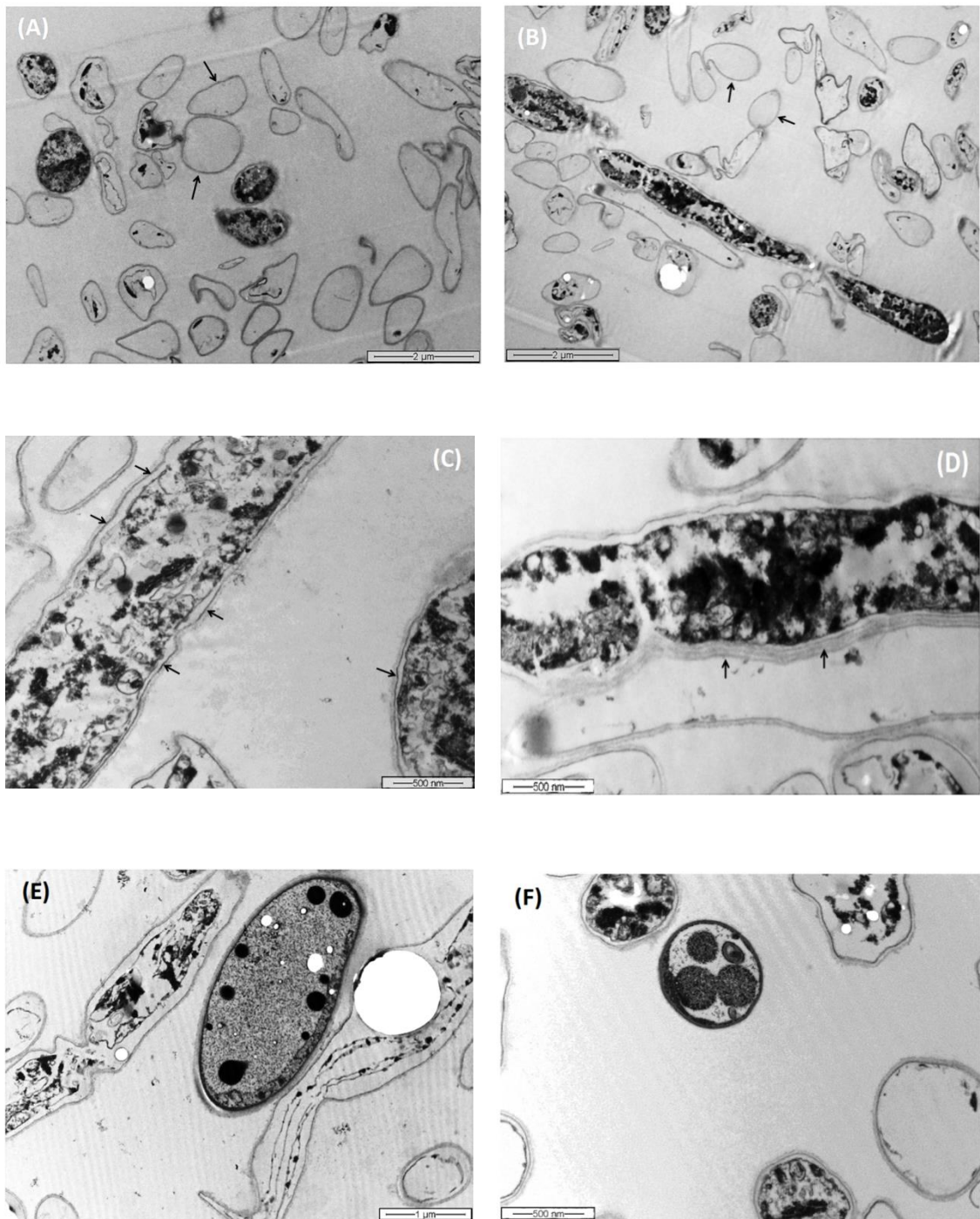


Figura 4: Microscopia eletrônica de transmissão das hifas do fungo *Pisolithus microcarpus* (A-F). Observa-se em A e B hifas “vazias” (setas), em C a camada de melanina subjacente à parede celular (setas), em D as diversas camadas da parede celular (setas) e em E e F conspícuos grânulos de polifosfato.

5.2. Caracterização Espectrográfica da Melanina

Com o objetivo de analisar os grupos funcionais presentes na melanina foram realizados espectros de infravermelho da melanina extraída das hifas do *Pisolithus* e da melanina liberada no meio de cultura. Na figura 5 pode-se observar as características mais importantes nos dois tipos de melanina, sendo estas: bandas fortes na região de 3400 cm^{-1} referentes aos grupos -OH e -NH, na região próxima a 2940 cm^{-1} observam-se vibrações dos grupamentos C-H de compostos alifáticos, a faixa entre $2300\text{-}2100\text{ cm}^{-1}$ é característica dos grupos $\text{C}\equiv\text{N}$ e na região de $1650\text{-}1600$ estão os grupamentos C=O de amida, C=C de compostos aromáticos e/ou $\text{COO}^- \text{ cm}^{-1}$.

A análise espectrográfica realizada sugere que estas melaninas são, provavelmente, do tipo DOPA-melanina, uma vez que a análise de infravermelho mostra absorções em diversas regiões muito similares às encontradas em DOPA-melaninas sintéticas (Stainsack et al., 2003) e DOPA-melaninas extraídas do fungo *Tuber melanosporum* e do basidiomiceto *Lentinula boryana* (Harki et al., 1997; Faria, 2004). Ainda não foi possível definir uma estrutura química exata para as melaninas, isso devido à dificuldade em extrair e purificar melaninas naturais, pois o seu alto peso molecular, a insolubilidade em solventes orgânicos e aquosos e a heterogeneidade, dificultam a sua caracterização (Henson et al., 1999). Mas, diversos métodos têm sido utilizados a fim de aperfeiçoar a caracterização das melaninas, como as análises de infravermelho, ressonância magnética nuclear, espectrometria de ressonância paramagnética eletrônica e difração de Raio-X (Cunha et al., 2010; Bridelli e Crippa, 2010; Chatterjee et al., 2012).

Recentemente Casadevall et al. (2012) analisaram, através da técnica de difração de Raio-X, as melaninas extraídas de quatro fungos: *Aspergillus niger*, *Wangiella dermatitides*, *Coprinus comatus* e *Cryptococcus neoformans*. Eles observaram uma diferença nas distâncias de empilhamento de planos dos pigmentos extraídos destes microrganismos, relatando que é concebível que as melaninas do reino Fungi compartilhem uma estrutura organizacional similar, porém os pigmentos de cada indivíduo diferem em detalhes na distância de empilhamento de planos, como um resultado de diferenças locais de composição e possivelmente componentes associados das melaninas.

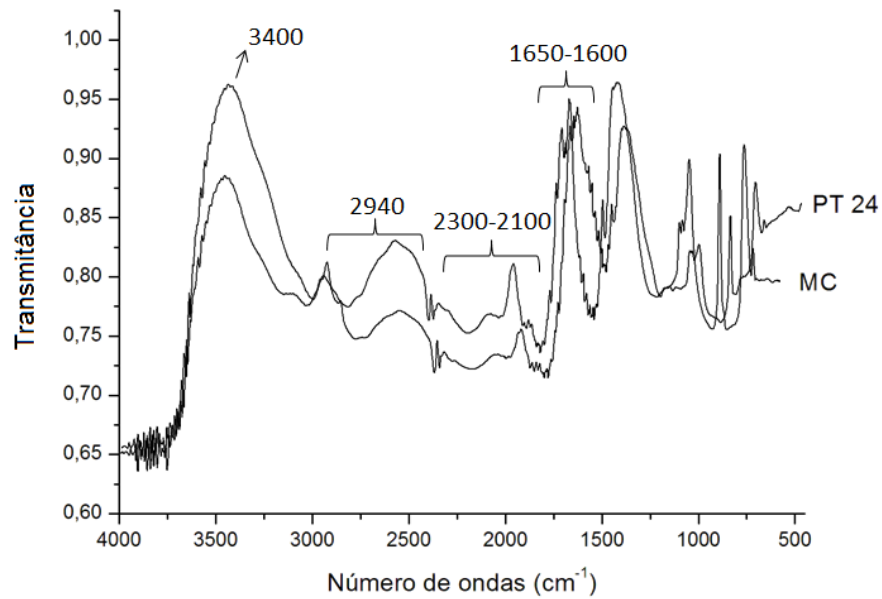


Figura 5: Espectro de infravermelho das melaninas produzidas pelo fungo *Pisolithus microcarpus*. PT24 (melanina extraída das hifas) e MC (melanina extraída do meio de cultura).

5.3. Hifas Fúngicas

5.3.1. Avaliações de Susceptibilidade ao Al em Placas de Petri (*in vitro*)

O fungo *Pisolithus microcarpus* (Isolado 24) mostrou ser tolerante ao alumínio, inclusive na maior dose testada (1000 μM). O diâmetro médio do micélio não apresentou qualquer diferença estatisticamente significativa nos tratamentos com Al em concentrações variando de 50 μM a 1 mM (Tabela 1, Figura 6).

Tabela 1. Porcentagem de inibição (-) ou estimulação (+) no crescimento de *Pisolithus microcarpus* PT 24 em seis doses de alumínio (AlCl_3), em meio MNM sólido, pH 4,5 $p < 0,05$.

Dose de AlCl_3 (μM)					
0	50	100	200	500	1000
0	-7,86	-1,26	+0,32	+1,89	+1,26

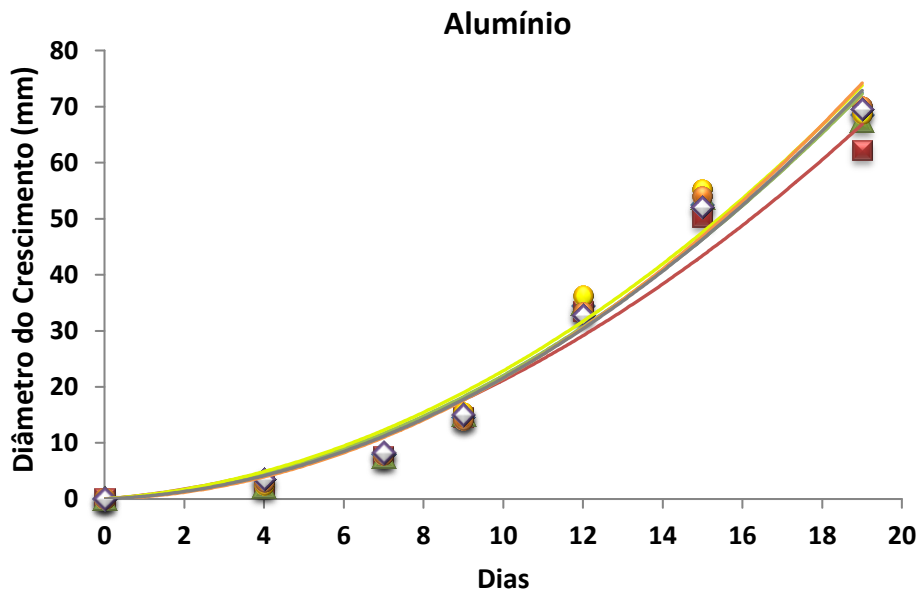


Figura 6: Médias do diâmetro micelial de *Pisolithus microcarpus* em meio de cultura sólido contendo doses crescentes de alumínio (AlCl_3). 0 (◆), 50 (■), 100 (▲), 200 (●), 500 (○) e 1000 (◇) $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Ray et al., (2005) e Targhetta (2008), também constataram uma alta tolerância do fungo *Pisolithus microcarpus* em meio sólido contendo altas concentrações de Al (400 ppm e 1 g L^{-1} , respectivamente), intrigantemente apresentando a mesma tendência de redução nas menores concentrações de Al. São diversos os mecanismos de detoxificação de metais em fungos ectomicorrízicos (Hall, 2002). No que se refere ao alumínio, merece destaque o

mecanismo envolvendo a ligação deste metal a cadeias de polifosfato (Vare, 1990; Tam, 1995), as quais estão presentes em enormes quantidades no fungo *Pisolithus microcarpus*, como evidenciado neste trabalho (Figura 4E, F).

As ectomicorrizas têm capacidade de acumular metais nas hifas extramatriciais, as quais são abundantes nesta associação, e possuem componentes com propriedades quelantes na sua parede celular, como: quitina, celulose, derivados de celulose e melanina (Galli et al., 1994). As melaninas contêm grupamentos, carboxílicos, fenólicos, hidroxílicos e grupamentos amina (Figura 5), que fornecem diversos sítios potenciais de ligação ou bioadsorção de íons metálicos (Fogarty e Tobim, 1996). Inclusive a presença de metais pode provocar um estímulo na produção de pigmentos extracelulares, como já constatado em *Pisolithus microcarpus* (Graziotti et al., 2001; Targhetta, 2008).

Estudos de toxicidade de metais, em meio de cultura, podem produzir resultados com grandes limitações de interpretação. Inicialmente, é preciso atentar para a tendência dos íons metálicos a reagir e se ligar aos macro e micronutrientes utilizados no meio de cultura, como fosfato e ferro, reduzindo assim a sua forma livre (Gadd, 1983). O pH do meio utilizado também influencia a quantidade de metal disponível, podendo causar a precipitação de hidróxidos e outras espécies insolúveis na faixa de pH fisiológico (Gadd, 1993). O alumínio em especial, se apresenta sob variadas espécies iônicas e pode formar complexos com diferentes potenciais de solubilidade e toxicidade dependendo do pH em questão (e.g., Kinraide, 1991; Façanha e De Meis, 1995; Façanha e Okorokova-Façanha, 2002).

Neste trabalho foi realizada uma especiação através do programa Visual MINTEQ, com o intuito de obter uma estimativa aproximada da real biodisponibilidade do alumínio no meio de cultura sólido. Foi possível obter uma alta concentração, variando entre 70 a 99%, dos íons liberados pelos reagentes que compõem o meio de cultura MNM: H_2PO_4 , SO_4^{-2} , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ e Cl^- (Tabela 2). Todavia, a biodisponibilidade do cátion trivalente Al^{3+} (uma das formas mais tóxicas deste elemento), foi comprometida e mesmo diminuindo a concentração de PO_4 e Fe, que são os íons que reagem mais facilmente com o Al, a biodisponibilidade de Al^{3+} ficou em cerca de 5% na dose de 50 μM e 12% na dose de 1000 μM de AlCl_3 . De acordo com a especiação realizada para este meio

de cultura, a maior parte do alumínio se encontra na forma de AlSO_4^+ , AlHPO_4^+ e $\text{Al}_2\text{PO}_4^{+3}$.

Mesmo não sendo possível ter um alto nível de confiança para os dados da tolerância do *P. microcarpus* ao Al *in vitro*, devido ao grande número de variáveis envolvidas, essa metodologia tem produzido informações consistentes na pesquisa básica. Parâmetros como morfologia de hifas, aparência do micélio, localização intracelular de metais, quantidade de metal absorvido e características do meio de cultura pós-experimento têm sido avaliados e compilados para um melhor entendimento de processos que ocorrem em diferentes condições experimentais (Targhetta, 2008).

Tabela 2. Concentração iônica e estimativa de biodisponibilidade (%) de Alumínio (Al^{3+}) no meio de crescimento de fungos ectomicorrízicos em diferentes concentrações. Controle = 0 mM Al^{3+} .

		Al^{3+}	H_2PO_4	SO_4^{-2}	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Na^+	Cl^-
Meio MNM	Controle	0	2,23	0,61	0,918	0,38	0,61	0,42	1,38
	0,050 mM	0,05	2,23	0,61	0,918	0,38	0,61	0,42	1,48
	0,100 mM	0,1	2,23	0,61	0,918	0,38	0,61	0,42	1,58
	0,200 mM	0,2	2,23	0,61	0,918	0,38	0,61	0,42	1,78
	0,500 mM	0,5	2,23	0,61	0,918	0,38	0,61	0,42	2,38
	1,000 mM	1,000	2,23	0,61	0,918	0,38	0,61	0,42	3,38
	Estimativa de Biodisponibilidade (%)	Controle	0,00	90,81	91,81	99,26	89,4	90,66	99,31
0,050 mM		4,55	90,76	90,01	99,11	85,65	88,37	99,26	99,74
0,100 mM		4,81	83,54	89,51	99,12	85,76	88,43	99,27	99,74
0,200 mM		5,39	70,11	88,34	99,14	86,00	88,57	99,29	99,74
0,500 mM		7,57	-	83,52	99,20	86,86	89,15	99,34	99,74
1,000 mM		12,04	14,88	72,22	99,31	88,70	90,55	99,44	99,74

5.3.2. Atividade ATPásica das Hifas Fúngicas

Para a extração das vesículas contendo as bombas de prótons do micélio de *P. microcarpus* foi necessária, primeiramente, uma adaptação na metodologia de extração, devido a este fungo possuir parede celular composta de quitina e celulose em diversas camadas, sendo necessária a quebra dessa parede no momento da extração. Foram testadas diversas formas de maceração do fungo utilizando enzimas líticas da parede celular, nitrogênio líquido, bolinhas de vidro (sigma) e grãos de areia, porém sem resultado positivo na atividade hidrolítica das bombas de H⁺. Até o presente momento, a forma de isolamento mais efetiva testada consistiu em macerar o micélio fúngico em liquidificador com o meio de extração, seguido dos passos de centrifugação diferencial para obtenção da fração microssomal. As atividades hidrolíticas das bombas de membrana plasmática e vacúolo foram estimadas usando seus respectivos pHs ótimos e inibidores específicos (Figura 7).

As atividades de hidrólise de ATP, realizadas em pH 6,5 e sensíveis ao ortovanadato de sódio (0,2 mM), foram relacionadas à atividade P-ATPásica de membrana plasmática. Enquanto as atividades hidrolíticas obtidas em pH 7,5 e sensíveis ao nitrato de potássio (50 mM), foram atribuídas a V-ATPase vacuolar. Ambas as atividades de P- e V-ATPases apresentaram uma cinética temporal peculiar de preparações microssomais instáveis, com aparente perda de função no decorrer dos 50 min de duração do ensaio (Figura 7A e B).

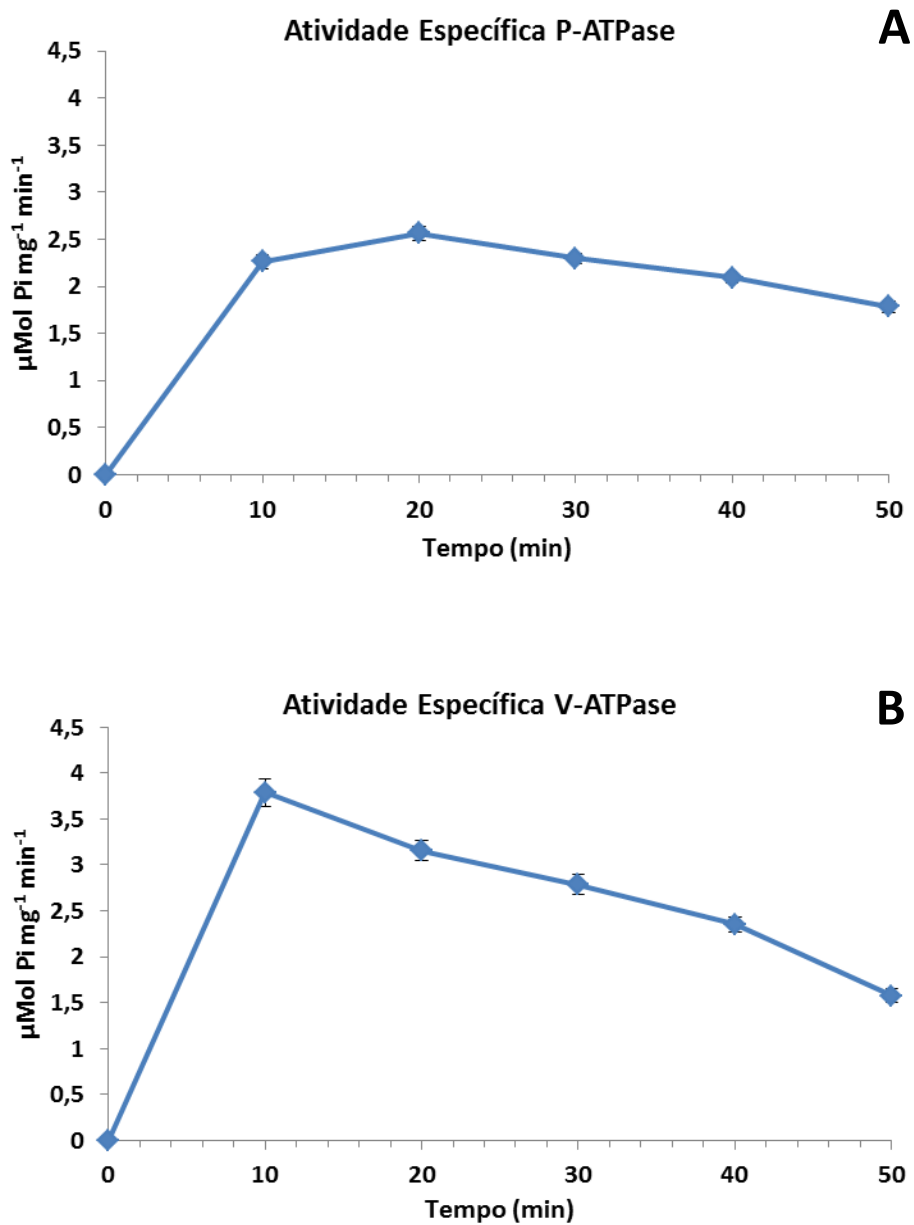


Figura 7: Atividade hidrolítica da P-H⁺-ATPase (A) e V-H⁺-ATPase (B) em vesículas microssomais isoladas de hifas do fungo *Pisolithus microcarpus* em função do tempo.

Foi realizada em seguida a medição do gradiente eletroquímico de H⁺, estimado através do decréscimo da fluorescência da sonda sensível a pH 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina (ACMA). O meio de reação foi composto de 10 mM de Mops-Tris (pH 6,5), 100 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂, ACMA 2 μM e 50 μg de proteína e a reação é desencadeada pela adição de 1 mM de ATP.

A primeira reação para medição do gradiente de H^+ foi iniciada com ATP, entretanto, não foi possível obter um gradiente de H^+ das membranas isoladas das hifas fúngicas. Testou-se iniciar a reação com a adição de proteína no meio contendo o ATP, obtendo desta forma um gradiente eletroquímico de H^+ (Figura 8). Vale ressaltar que as preparações das hifas fúngicas continham pigmentos melânicos naturalmente produzidos por este fungo.

Estudos clássicos, feitos em meados da década de 80 e 90, proveram evidências da existência de um sistema de bombeamento de H^+ energizado por potencial redox, induzido na membrana plasmática via transporte de equivalentes reduzidos de substratos intracelulares para aceptores extracelulares de elétrons (Bottger et al., 1985; Lyn, 1984; Sumons et al., 1984). Em quase todos os tecidos vegetais e sistemas celulares estudados, a adição de ferrocianeto provoca uma acidificação do meio extracelular (Rubistein e Luster, 1993). Deste modo, hipotetizamos a ocorrência de uma íntima associação entre a atividade redox das melaninas sobre a membrana plasmática com a extrusão de H^+ e o gradiente eletroquímico verificado na ausência de ATP, em membranas incubadas com melanina (Figura 8).

Segundo este modelo, a extrusão de H^+ poderia estar ocorrendo de três formas: a primeira seria em nível da cadeia redox, similarmente à verificada nas mitocôndrias e membranas tilacoides, na segunda forma um agente redutor do tipo XH_2/X na superfície externa da membrana plasmática doaria elétrons, por exemplo, para o ferrocianeto liberando H^+ no meio, na última forma o transporte de elétrons para o ferrocianeto ativaria as H^+ -ATPases de membrana plasmática, responsáveis pelo principal mecanismo de extrusão de H^+ (Marré et al., 1988).

Corroborando tal hipótese, foram encontradas evidências ainda mais remotas, datadas de 1970, relatando a capacidade da melanina de reduzir o ferrocianeto, citocromo c e DCPIP e de oxidar o NADH, agindo como um agente de transferência de elétrons do NADH para tais moléculas (Van Woert, 1968; Gan et al., 1976). Adicionalmente, também foi verificado que auxinas (IAA e 2,4-D) são capazes de estimular a oxidação do NADH (Morré et al., 1986) e promover a acidificação do citoplasma em hipocótilos de soja (Morré, 1970). Vale ressaltar que este fitormônio foi detectado em exsudatos contendo melanina do fungo *Pisolithus microcarpus* (Frankenberger e Poth, 1987), e que ácidos húmicos

atuam estimulando a formação de gradientes eletroquímicos de H^+ , via presença de IAA em sua macroestrutura (Canellas et al., 2002).

Analisados em conjunto, os dados aqui obtidos com os da literatura citada, é possível sugerir a possibilidade da existência de um sistema de oxirredução acoplado à formação de gradientes eletroquímicos na membrana plasmática, os quais seriam induzidos por fluxos eletrônicos estabelecidos entre melaninas ou ácidos húmicos presentes nas circunvizinhanças da rizosfera e da hifosfera. Para testar mais eficazmente tal modelo, estamos delineando futuros estudos dos fluxos de prótons medidos em células vegetais e fúngicas vivas, usando sistemas de microeletrodos vibráteis.

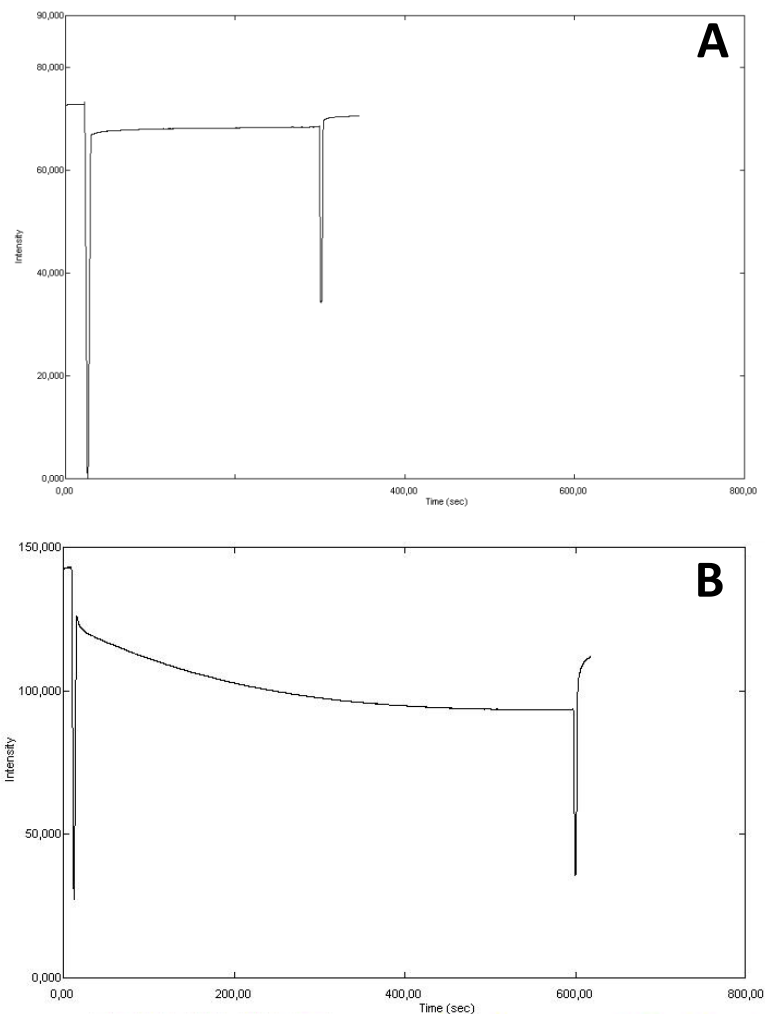


Figura 8: Gradiente eletroquímico de prótons, iniciado com ATP (A) e iniciado com a proteína (B), de vesículas microssomais isoladas de hifas do fungo *Pisolithus microcarpus*, contendo pigmentos melânicos naturalmente produzidos por este fungo.

5.3.3. Ação do alumínio *In vitro* e *In vivo* sobre as bombas de prótons

A partir da adaptação da metodologia de isolamento de vesículas de membrana plasmática e de tonoplasto das hifas fúngicas, foi possível testar concentrações crescentes de alumínio (AlCl_3) no meio de reação contendo as vesículas isoladas das hifas do *P. microcarpus*. Foram testadas doses de até 1 mM, e as hidrólises de ATP da P- H^+ -ATPase e da V- H^+ -ATPase não sofreram alterações significativas com o incremento das doses de alumínio (Figura 9).

Este resultado demonstra uma insensibilidade das bombas de H^+ a uma ampla faixa de concentração de Al (10 μM a 1 mM). Zhang et al. (1998) e Ahn et al (2002) verificaram uma inibição da H^+ -ATPase de membrana plasmática em plantas de trigo e abóbora tratadas com 100 μM de AlCl_3 *in vitro*, contrastando com o resultado supracitado, sugerindo ser a insensibilidade da H^+ -ATPase (Figura 9) parte do mecanismo pelo qual o fungo *P. microcarpus* expressa sua grande tolerância ao Al (Tabela 1, Figura 6).

Foram também realizados experimentos *in vivo*, em que as hifas fúngicas foram incubadas por 5 min em meio suplementado com alumínio (Figura 10). Para este experimento não foi possível utilizar doses elevadas do metal devido à ocorrência de precipitação deste em pH 4,5. A atividade hidrolítica da P- H^+ -ATPase não apresentou diferenças significativas nas doses de 50 e 100 μM em relação ao controle. Porém, doses menores de Al como 10 μM , provocaram um efeito estimulante nessas enzimas, as quais tiveram sua atividade hidrolítica estimulada em cerca de 750%. A V- H^+ -ATPase apresentou comportamento semelhante ao das enzimas citadas anteriormente, tendo sua atividade inibida de 20 a 40 % nas concentrações mais elevadas de Al, e estimulada na mais baixa concentração testada, em cerca de 260%. Semelhante ao verificado neste trabalho, Façanha e Okorokova-Façanha (2002), observaram um aumento da atividade hidrolítica da P- H^+ -ATPase de plantas de milho tolerante ao Al, submetidas a concentrações de Al que não produziam efeitos nocivos *in vivo*, e inibição da atividade dessas bombas em concentrações mais elevadas, nas quais a inibição do crescimento radicular já se fazia presente.

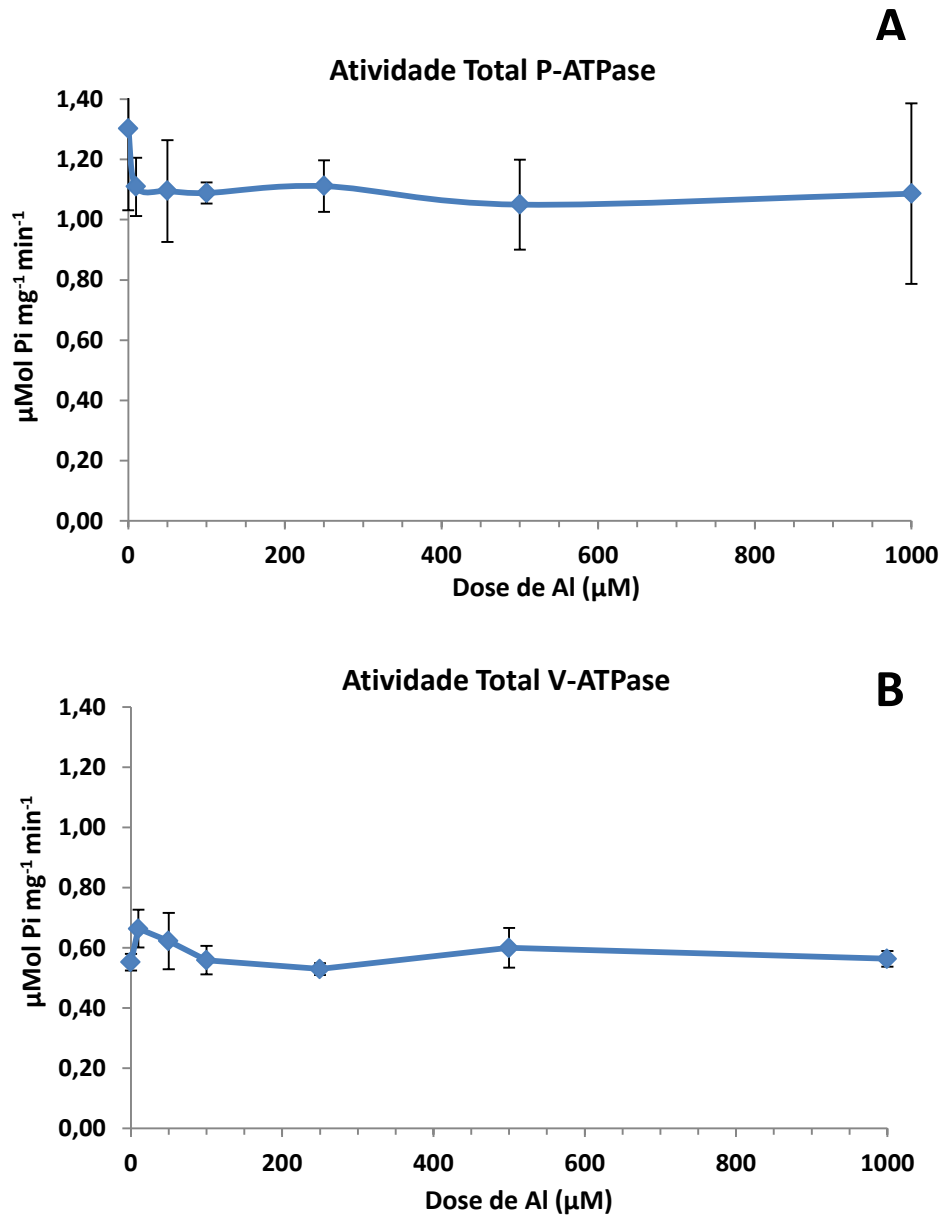


Figura 9: Efeito do Al na atividade hidrolítica da P-H⁺-ATPase (A) e V-H⁺-ATPase (B) em vesículas microssomais isoladas de hifas do fungo *Pisolithus microcarpus* tratadas *in vitro*. Os valores são médias \pm erro padrão, n=3.

O alumínio é o metal mais abundante na crosta terrestre e sobre condições de solo ácido a especiação dos seus compostos naturalmente presentes no solo muda de tal forma, que o Al se torna altamente solúvel e tóxico (Hamilton et al., 2001A). Sua toxicidade e respectivas induções de deficiências nutricionais têm

sido consideradas fatores primários na limitação da produtividade agrícola em solos ácidos (Foy et al., 1978).

Um dos objetivos deste trabalho, foi o de ampliar o entendimento dos mecanismos celulares de detoxificação do Al no fungo *P. microcarpus* envolvendo a participação ativa das H⁺-ATPases. Estas enzimas desempenham um papel essencial na fisiologia de células vegetais e fúngicas, gerando um gradiente eletroquímico que promove o transporte de aminoácidos, açúcares e íons inorgânicos. Foi relatada a modulação das bombas de H⁺ pelo Al em plantas e em algumas leveduras (Matsumoto, 1988; Façanha e de Meis, 1995; Lobão et al., 2007; Kim et al., 2010), entretanto, em ectomicorrizas, este mecanismo é inédito.

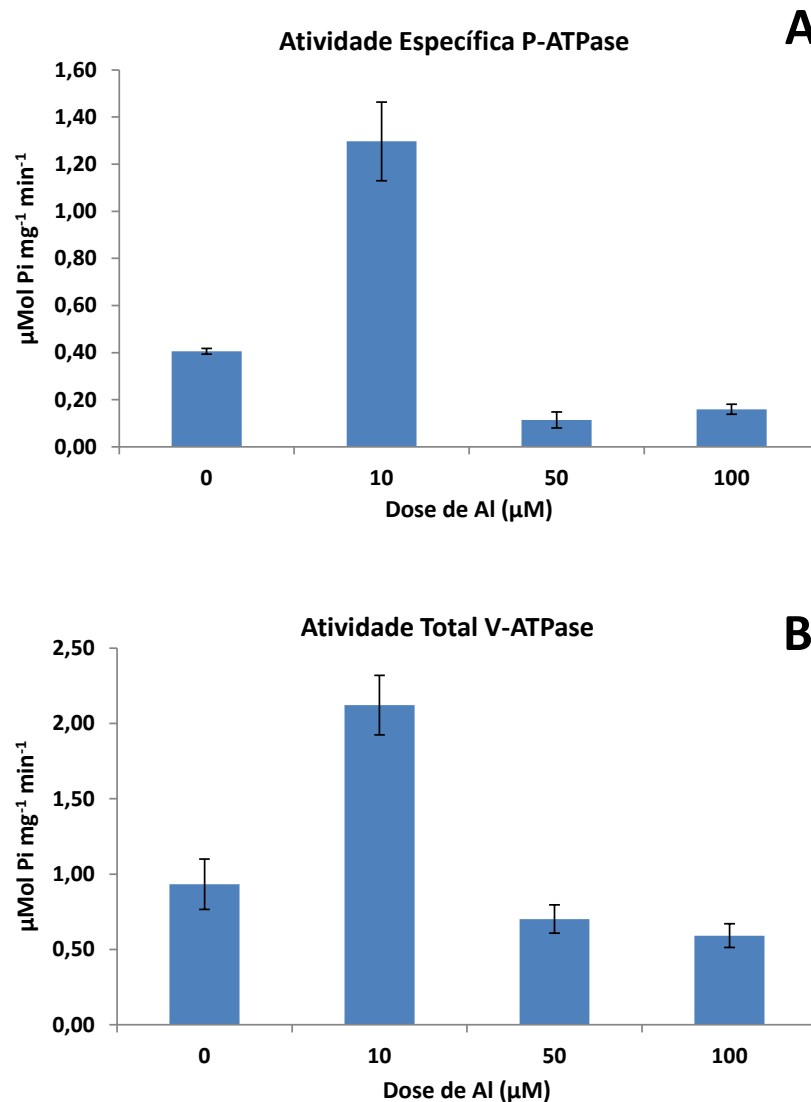


Figura 10: Efeito do Al na atividade hidrolítica da P-H⁺-ATPase (A), V- H⁺-ATPase (B) em vesículas microsossomais isoladas de hifas do fungo *P. microcarpus*: controle e tratadas *in vivo* com 10, 50 e 100 μM AlCl_3 .

Neste trabalho foi observada uma modulação diferencial das bombas de H⁺ nas condições *in vitro* e *in vivo*. Não foi verificada uma alteração significativa na atividade hidrolítica das H⁺-ATPases do tipo P e V das hifas fúngicas submetidas a até 1 mM de Al *in vitro*, já na condição *in vivo* a atividade das bombas de H⁺ sofreu uma ativação quando submetida à menor concentração de Al testada (10 μM). Resultados qualitativamente parecidos foram descritos para raízes de milho submetidas a doses de Cd²⁺, em que este metal estimulou a atividade hidrolítica das H⁺-ATPases de membrana plasmática *in vivo* e *in vitro* não houve alteração da atividade destas enzimas (Burzynski e Kolano, 2003).

Este tipo de modulação diferencial das bombas de H⁺ em condições *in vitro* e *in vivo* sugere uma regulação destas enzimas em nível transcricional, levando a um aumento da sua expressão gênica. Foi constatado um aumento na expressão das H⁺-ATPases induzido pelo alumínio de uma forma dose-dependente em raízes de soja (Shen et al., 2005), de trigo (Hamilton et al., 2001 A) e na levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Hamilton et al., 2001B). Além disso, estudos confirmam que existem sítios de ligação do alumínio tanto na parede celular quanto no citoplasma, como também no núcleo (Matsumoto et al., 1976; Silva et al., 2000). As H⁺-ATPases possuem um domínio catalítico, hidrofílico, localizado em alças que estão localizadas na face citoplasmática da membrana, e portanto, pode consistir em um dos sítios de ligação ou de interação direta do alumínio na célula vegetal (Ahn et al., 2001).

5.4. Atividade ATPásica de raízes de *Eucalyptus urograndis*

A fim de caracterizar a atividade das ATPases de membrana plasmática e de tonoplasto do *Eucalyptus urograndis* (hospedeiro com alta afinidade pelo fungo *Pisolithus microcarpus*) em resposta ao alumínio, foi realizada a extração de frações microsomais das raízes desta espécie vegetal, e estas foram submetidas a diferentes doses de alumínio (0, 5, 20, 50 μM AlCl₃) *in vitro*. Foram testadas as atividades hidrolíticas das H⁺-ATPases do tipo P, V (pH 6,5 e 7,0) F1F0-ATPase (fração mitocondrial, pH 8,0) e da H⁺-PPase vacuolar (pH 7,0).

Al na concentração de 5 μ M provocou um estímulo de mais de 30% na atividade da P-H⁺-ATPase e de mais de 40% relacionada a F1F0-ATPase. A atividade hidrolítica da V-H⁺-ATPase foi inibida em todas as concentrações (50,72%, 47,83% e 50,73% sob 5, 20 e 50 μ M de Al, respectivamente). Enquanto a atividade da H⁺-PPase não sofreu alterações significativas, com uma tendência, no entanto, para inibição por volta de 15% em relação à atividade controle (Figura 11).

As bombas de H⁺ de membrana plasmática possuem a característica de uma resposta mais imediata aos estresses provocados pelos metais, como a resposta ao Al descrita em plantas de milho tolerante (Façanha e Okorokova-Façanha, 2002). Apesar de ser um elemento tóxico, o alumínio frequentemente estimula o crescimento de diversos vegetais, sendo que este efeito benéfico pode estar ocorrendo através do aumento da polaridade elétrica da membrana e da extrusão de H⁺ (Kinraid, 1988; Yan et al., 1992; Yan et al., 1998), envolvendo a participação significativa das H⁺-ATPases (Façanha e Okorokova-Façanha, 2002).

Entre as diferentes enzimas analisadas, a F1F0-ATPase apresentou a maior atividade entre elas (Figura 11). Tem sido teorizado a ocorrência de um balanço de energia em organismos expostos ao alumínio, em que a V-H⁺-ATPase estaria envolvida na detoxificação do alumínio, uma vez que o seu potencial de membrana forneceria a energia necessária para um transporte ativo secundário, que levaria ao influxo de alumínio no vacúolo e posterior detoxificação do mesmo. Para que este mecanismo possa ocorrer a F1F0-ATPase teria sua atividade aumentada fornecendo, assim, o ATP necessário para o funcionamento da H⁺-ATPase vacuolar (Hamilton et al., 2001 A; Hamilton et al., 2001 B).

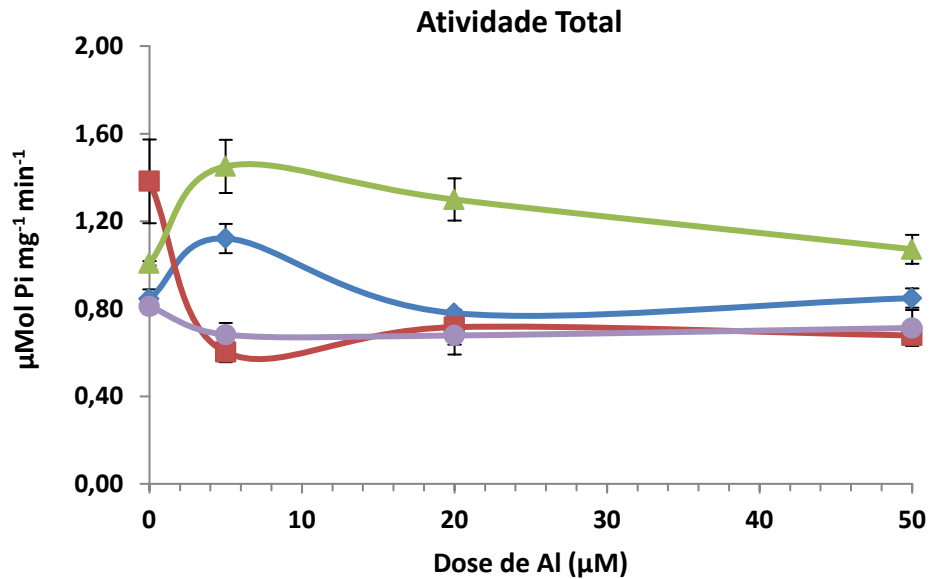


Figura 11: Efeito do Al na atividade hidrolítica da P-H⁺-ATPase (◆), V-H⁺-ATPase (■), F1F0-ATPase (▲) e H⁺-PPase (●) medida em vesículas microssomais isoladas de raízes de *Eucalyptus urograndis* tratadas *in vitro*. Os valores são médias ± erro padrão, n=3.

5.5. *Pisolithus microcarpus* x *Eucalyptus urograndis*

Foram realizados experimentos com plantas de *Eucalyptus urograndis* micorrizadas ou não com o fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus*, tratadas por cinco dias com diferentes concentrações de alumínio (0, 200 e 1000 µM AlCl₃). Após o tratamento as vesículas contendo as H⁺-ATPases de membrana plasmática foram isoladas das raízes e analisadas em relação à sua atividade hidrolítica. As plantas em associação com o *P. microcarpus* obtiveram valores maiores de atividade hidrolítica do ATP em relação ao controle, sendo estimuladas em 24%, 48% e 43%, nas concentrações de 0, 200 e 1000 µM AlCl₃, respectivamente (Figura 12).

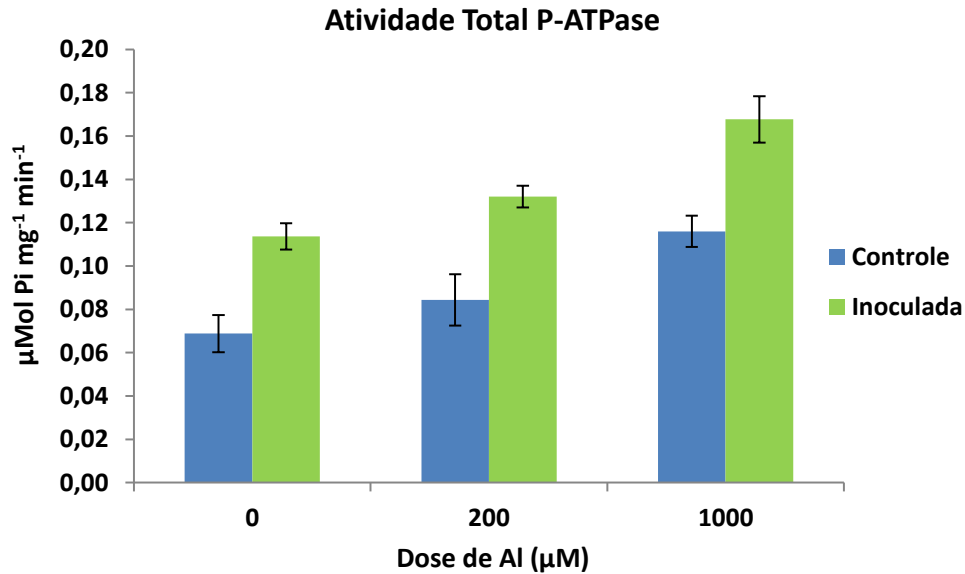


Figura 12: Efeito do Al na atividade hidrolítica da P-H⁺-ATPase medida em vesículas microsossomais isoladas de raízes de *Eucalyptus urograndis* inoculadas ou não com o fungo micorrízico *Pisolithus microcarpus*.

Assim como neste trabalho, plantas de *Eucalyptus grandis* inoculadas com o fungo *Pisolithus microcarpus*, submetidas a doses de 200 e 1000 µM de MnCl₂, obtiveram maior atividade hidrolítica da P-H⁺-ATPase em relação ao controle. Também foi relatada na parte aérea de tais plantas uma maior concentração dos nutrientes nitrogênio e fósforo, e uma menor concentração do metal manganês (Dados não publicados).

Os dados obtidos no presente estudo dão suporte ao já relatado potencial benéfico das ectomicorrizas para os seus hospedeiros em ambientes contaminados com metais, destacando o papel das bombas de H⁺ neste mecanismo, uma vez que as ATPases possuem a função de bombear prótons para fora da célula, gerando um gradiente eletroquímico e um potencial de membrana, os quais são a força motora para a entrada e saída de aminoácidos, açúcares e íons inorgânicos na célula. Por conseguinte, uma maior atividade hidrolítica das P-H⁺-ATPases em plantas micorrizadas implica em uma maior absorção de nutrientes pela célula, inclusive de metais (Goffeau e Slayman, 1981), sendo estes posteriormente detoxificados pelos diversos vacúolos fúngicos (Galli et al., 1994).

O gradiente eletroquímico de H^+ e o potencial de membrana gerado pelas ATPases favorecem também a exudação de ácidos orgânicos como, por exemplo, o oxalato cuja produção é induzida por metais como o alumínio em plantas micorrizadas, com a função de quelação dos metais impedindo o efeito tóxico destes elementos no hospedeiro (Ahonen-Jonnarth et al., 2000; Ahn et al., 2004; Koshla et al., 2009).

5.6. *Eucalyptus urograndis* x Alumínio x Melanina

A melanina extraída do fungo *Pisolithus microcarpus* foi também avaliada como um possível quelante do alumínio, diminuindo assim o efeito tóxico deste metal sobre as células. Neste experimento, incubou-se por cinco minutos, *in vitro*, este pigmento (10 mg C L^{-1}) com 5 ou 500 μM de AlCl_3 a pH 4,0 conjuntamente com as membranas isoladas de raízes de *Eucalyptus urograndis*, e a atividade hidrolítica das P- H^+ -ATPases foi, então, analisada.

O tratamento com melanina, com ou sem alumínio, provocou uma inibição de mais de 40% da atividade hidrolítica da P- H^+ -ATPase, atingindo mais de 50% na presença de 500 μM Al. O tratamento somente com metal, também provocou uma inibição bem menos acentuada da atividade hidrolítica de tais bombas (7,7% em 5 μM Al e 17,31% em 500 μM Al), sugerindo que o efeito inibitório do Al estaria sendo potencializado pelo tratamento com melanina (Figura 13).

Os dados obtidos neste experimento mostram um efeito contrário ao comumente descrito na literatura, em que o pigmento melanina, encontrado em diversos fungos e em especial nas ectomicorrizas, atuaria como um quelante de metais, diminuindo os efeitos tóxicos destes para as plantas (Gadd, 1993). No entanto, nas condições experimentais aqui descritas, a melanina provocou uma inibição significativa na atividade hidrolítica das H^+ -ATPases de membrana plasmática. Tal efeito inibitório foi previamente descrito para outras substâncias com características análogas às melaninas, como os ácidos húmicos.

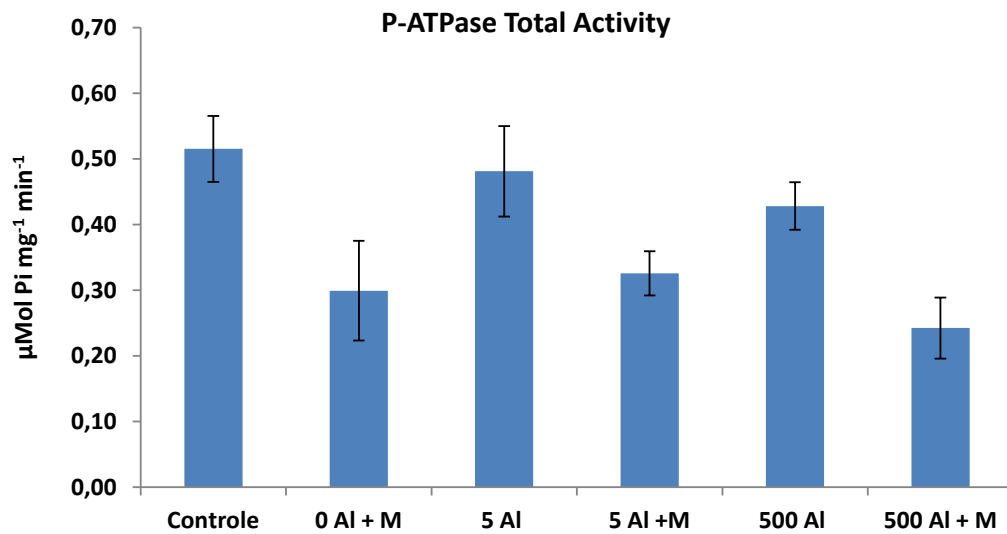


Figura 13: Porcentagem de inibição/estímulo da atividade hidrolítica total da P-H⁺-ATPase medida em vesículas microsossomais isoladas de raízes de *Eucalyptus urograndis*, incubadas *in vitro* com melanina (M = 10 mg C L⁻¹) e com 0, 5 ou 500 μM de AlCl₃ pH 4,0.

Como citado anteriormente, melaninas possuem diversas similaridades com os ácidos húmicos, como composição elementar, comportamento em meio ácido e básico e atividades do tipo auxínica (Koroleva, et al., 2007). Os ácidos húmicos quando adicionados ao meio de reação contendo vesículas de membrana plasmática isoladas de raízes de milho, inibem a atividade hidrolítica das P-H⁺-ATPases (Canellas et al., 2002), assim como observado na Figura 13 com a melanina extraída do fungo *Pisolithus microcarpus*.

In vivo, a ação dos ácidos húmicos é diferente, estes provocam um estímulo na hidrólise de ATP das bombas de H⁺ e no crescimento radicular (Façanha et al., 2002; Dobbs et al., 2010). Já foi verificado um estímulo no crescimento de mudas de rabanete, canola, tomate e alface, provocado pela melanina extraída da bactéria *Azotobacter chroococcum*, adicionada em meio de cultura contendo somente água, ágar e o pigmento em questão (Gospadaryov e Lushchack, 2011).

Têm sido sugeridas algumas hipóteses para o estímulo no crescimento de plantas provocado pelo ácido húmico, que também poderiam corresponder à ação

das melaninas, em que este efeito estimulatório estaria sendo induzido pela associação destas moléculas a receptores específicos na superfície celular ou então, que os ácidos húmicos (e outras substâncias orgânicas similares, como as melaninas) poderiam liberar pequenas moléculas bioativas da sua macroestrutura, as quais viriam a interagir com receptores na membrana plasmática ou dentro da célula (Canellas et al., 2002).

Já foi detectada, através de testes imunoenzimáticos - ELISA, a presença de grupos de auxina em ácidos húmicos extraídos de vermicomposto (Nardi et al., 2000) e em exsudatos liberados pelo fungo *Pisolithus microcarpus*, através das técnicas de HPLC, ELISA e cromatografia gasosa (Frankenberger e Poth, 1987). Este fitormônio poderia estar relacionado à ativação das H⁺-ATPases, uma vez que a auxina age como um regulador chave do desenvolvimento de raízes laterais (Audenaert et al., 2013), de acordo com a teoria do crescimento ácido, através da acidificação do apoplasto causada pela ativação das P-H⁺-ATPases (Rayle e Cleland, 1992). Todavia, nenhuma atividade estimulatória da melanina sobre as H⁺-ATPases, foi possível ser detectada, pelo menos até o presente momento.

6. CONCLUSÕES

Em síntese, pode-se verificar que a ultraestrutura de *Pisolithus microcarpus* possui uma conspícua rede vacuolar, compatível com uma participação importante dos principais sistemas responsáveis pelas funções desta organela no desenvolvimento deste fungo ectomicorrízico, como a V-ATPase cuja atividade foi evidenciada neste trabalho. Evidenciou-se também uma íntima relação estrutural e funcional das melaninas produzidas por este fungo, aqui caracterizadas como DOPA-melaninas, com as membranas celulares. Um gradiente eletroquímico de H^+ foi detectado na reação disparada com a proteína, sugerindo a participação dessas melaninas em um sistema redox capaz de atuar na energização da membrana plasmática. Ficou caracterizada a resistência ao Al das bombas protônicas de ambos simbiontes, *P. microcarpus* e *Eucalyptus urograndis*. A potencialização da inibição induzida por Al sobre as P- H^+ -ATPases, pelas melaninas, sugere uma reavaliação do conceito amplamente aceito da ação holística destes pigmentos como poderosos quelantes na detoxificação de Al e de outros metais. Por fim, a labilidade das frações microsossomais foi aqui analisada, mas o estabelecimento de uma preparação efetiva continua a ser um desafio a ser superado para uma abordagem mais completa da ação regulatória da melanina sobre os principais sistemas transdutores de energia das membranas deste fungo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAF, Anuário estatístico da ABRAF 2010 ano base 2009. Brasília: Semear Editora Gráfica Ltda., 2010. 140p.

Adriansen, K., Lelie, D.V.D., Laere, A.V., Vangrosveld, J., Colpaert, J.V. (2003) A zinc-adapted fungus protects pines from zinc stress. *New Phytologist*, 161:549-555.

Ahn, S.J., Rengel, Z., Matsumoto, H. (2004) Aluminum-induced plasma membrane surface potential and H⁺-ATPase activity in near-isogenic wheat lines differing in tolerance to aluminum. *New Phytologist*, 162:71-79.

Ahn, S.J., Sivaguru, M., Chung, G.C., Rengel, Z., Matsumoto, H. (2002) Aluminium-induced growth inhibition is associated with impaired efflux and influx of H⁺ across the plasma membrane in root apices of squash (*Cucurbita pepo*). *Journal of Experimental Botany*, 53:1959-1966.

Ahn, S.J., Sivaguru, M., Osawa, H., Chung, G.C., Matsumoto, H. (2001) Aluminum inhibits the H⁺-ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots. *Plant Physiology*, 126:1381-1390.

Ahonen-Jonnarth, U., Hees, P.A.W.V., Lundstrom, U.S., Finlay, R.D. (2000) Organic acids produced by mycorrhizal *Pinus sylvestris* exposed to elevated aluminium and heavy metal concentrations. *New Phytologist*, 146:557-567.

Alvarez, M., Huygens, D., Díaz, L.M., Villanueva, C.A., Heyser, W., Boeckx, P. (2011) The spatial distribution of acid phosphatase activity in ectomycorrhizal tissues depends on soil fertility and morphotype, and relates to host plant phosphorus uptake. *Plant, Cell & Environment*, 35:126–135.

Alves, J.R., Souza, O. Podlech, P.A.S., Giachini, A.J., Oliveira, V.L. (2001) Efeito de inoculante ectomicorrízico produzido por fermentação semi-sólida. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36:307-313.

Alves, R.M.N. (1997) Comportamento diferencial ao Al em solução nutritiva de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), sensível e tolerante e das espécies florestais *Cássia Verrugosa* (*Senna multijuga* (L.C. Rich.)) e Ipê Mirin (*Stenolobium stans* (Jun.)). Tese (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Lavras – MG - Universidade Federal de Lavras, UFLA, 92p.

Alviano, C.S., Farbiarz, S.R., Souza, W., Angluster, J., Travassos, L.R. (1991) Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* melanina. *Journal of General Microbiology*, 137:837-844.

Ashford, A.E. (1998) Dynamic Pleiomorphic Vacuole Systems: Are They Endosomes and Transport Compartments in Fungal Hyphae? *Advances in Botanical Research*, 28:119–159.

Ashford, A.E., Ryde, S., Barrow, K.D. (1994) Demonstration of a short chain polyphosphate in *Pisolithus tinctorius* and the implications for phosphorus transport. *New Phytologist*, 126:239–247.

Audenaert, D., De Rybel, D., Nguyen, L., Beeckman, T. (2013) Small-Molecule Screens to Study Lateral Root Development. *Plant Organogenesis Methods in Molecular Biology*, 959:189-195.

- Augé, R.M. (2001) Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal. *Mycorrhiza*, 11:3-42.
- Baptista, P., Tavares, R.M., Lino-Neto., T. (2011) Signaling in ectomycorrhizal symbiosis establishment. *Diversity and Biotechnology of Ectomycorrhizae Soil Biology*, 25:157-175.
- Barluzzi, R., Brozzetti, A., Mariucci, G., Tantucci, M., Neglia, R.G., Bistoni, F., Blasi, E. (2000) Establishment of protective immunity against cerebral cryptococcosis by means of an avirulent, non melanogenic *Cryptococcus neoformans* strain. *Journal of Neuroimmunology*, 109:75–86.
- Basso, L.H.M., Gonçalves, A.N., Silveira, L.V.A., Lima, G.P.P. (2003) Efeito do alumínio no crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivadas *in vitro*. *Scientia Forestalis*, 63:167-177.
- Beguiristain, T., Cote, R., Rubini, P., Jay-Allemand, C., Lapeyrie, F. (1995) Hypaphorine accumulation in hyphae of the ectomycorrhizal fungus, *Pisolithus tinctorius*. *Pytochemistry*, 40:1089-1091.
- Bell, A.A., Puhalla, J.E., Tolmsoff, W.J., Stipanovic, R.D. (1976) Use of mutants to establish (+)-scytalone as an intermediate in melanin biosynthesis by *Verticillium dahliae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 22:787-99.
- Bell, A.A., Wheeler, M.H. (1986) Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annuals Reviews of Phytopathology*, 24:411-451.
- Bellion, M., Courbot, M.C., Jacob, C., Blaudez, D., Chalot, M. (2006) Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 254:173-181.

- Berliner, D. L., Erwin, R. L., McGee, D. R. Methods of treating Parkinson's disease using melanin. Int. A61K 037/00. U. S. n. 5,210,076, 5 de Novembro de 1990, 11 de Maio de 1993.
- Bisinoti, M.C., Yabe, M.J.S., Gimenez, S.M.N. (2004) Avaliação da influência de metais pesados no sistema aquático da bacia hidrográfica da cidade de Londrina PR. *Revista Analítica*, 8:22-27.
- Boller, T., Wiemken, A. (1986) Dynamics of Vacuolar Compartmentation. *Annual Review of Plant Physiology*, 37: 137-164.
- Bottger, M., Bigdon, M., Soll, H.J. (1985) Proton translocation in corn coleoptiles: ATPase or redox chain. *Planta*, 163:376-380.
- Boyd, S.A., Sommers, L.E., Nelson, D.W., West, D.X. (1981) The mechanism of copper(II) binding by humic acid: An electron spin resonance study of a copper(II)-humic acid complex and some adducts with nitrogen donors. *Soil Science Society of America Journal*, 45:745-749.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of the protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bridelli, M.G., Crippa, P.R. (2010) Infrared and Water Sorption Studies of the Hydration Structure and Mechanism in Natural and Synthetic Melanin. *The Journal of Physical Chemistry*, 114:9381–9390.
- Burzynski, M., Kolano, E. (2003) *In vivo* and *in vitro* effects of copper and cadmium on the plasma membrane H⁺-ATPase from cucumber (*Cucumis sativus* L.) and maize (*Zea mays* L.) roots. *Acta Physiologiae Plantarum*, 25:39-45.
- Butler, M. J., Day, A. W. (1998) Fungal melanins: A review. *Canadian Journal of Microbiology*, 44:1115–1136.

Butler, M.J., Day, A.W. (1998) Fungal melanins: a review. *Can. J. Microbiol.*, 44:1115-1136.

Butler, M.J., Gardiner, R.B., Day, A.W. (2005) Fungal melanin detection by the use of copper sulfide-silver. *Mycologia*, 97:312-319.

Cairney, J.W.G. (2011) Ectomycorrhizal fungi: the symbiotic route to the root for phosphorus in forest soils. *Plant and Soil*, 344:51-71.

Canellas, L.P., Teixeira Júnior, L.R.L., Dobbss, L.B., Silva, C.A., Medici, L.O., Zandonadi, D.B., Façanha, A.R. (2008) Humic acids crossinteractions with root and organic acids. *Annals of Applied Biology*, 153:157-166.

Canellas, L.P., Velloso, A.C.X., Rumjanek, V.M., Guridi, F., Olivares, F.L., Santos, G.A., Braz-Filho, R. (2002) Distribution of the humified fractions and characteristics of the humic acids of an ultisol cultivation of Eucalyptus and sugar cane. *Terra*, 20:370-381.

Casadevall, A., Nakouzi, A., Crippa, P.R., Eisner, M. (2012) Fungal melanins differ in planar stacking distances. *Plos one*, 7: e30299.

Chakravarty, P., Unestam, T. (1987) Differential influence of ectomycorrhizae on plant growth and disease resistance in *Pinus sylvestris* seedlings. *Journal of Phytopathology*, 120:104-120.

Chatterjee, S., Prados-Rosales, R., Frases, S., Casadevall, A., Stark, R.E. (2012) Using Solid-State NMR To Monitor the Molecular Consequences of *Cryptococcus neoformans* Melanization with Different Catecholamine Precursors. *Biochemistry*, 51:6080–6088.

Clemens, S. (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, 212:475-486.

Cole, L., Orlovich, D.A., Ashford, A.E., (1998) Structure, Function, and Motility of Vacuoles in Filamentous Fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 24:86–100.

Colpaert, J.V., Van Tichelen, K.K., Van Assche, J.A., Laere, A.V. (1999) Short-term phosphorus uptake rates in mycorrhizal and non-mycorrhizal roots of intact *Pinus sylvestris* seedlings. *New Phytologist*, 143:589-597.

Colpaert, J.V., Van Assche, J.A. (1993) The effects of cadmium on ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* L. *New Phytologist*, 123:325–333.

Cosgrove, D.J. (1997) Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *Plant Cell*, 9:1031–1041.

Cosgrove, D.J. (2000) Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*, 407:321-326.

Cumming, J.R., Ning, J. (2003) Arbuscular mycorrhizal fungi enhance aluminium resistance of broomsedge (*Andropogon virginicus* L.). *Journal of Experimental Botany*, 54:1447-1459.

Cunha M.M.L., Franzen, A.J., Seabra, S.H., Herbst, M.H., Vugman, M.V., Borba, L.P., Souza, W., Rozental, S. (2010) Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals. *BMC Microbiology*, 10:1-9.

D'Amato, R. J. Use of melanin for inhibition of angiogenesis and macular degeneration. Int. A61K 038/00. U.S. n. 6,525,019. 28 de Setembro de 2001, 25 de Fevereiro de 2003.

Dauphin, A., Gerard, J., Lapeyrie, F., Legue, V (2007) Fungal hypaphorine reduces growth and induces cytosolic calcium increase in root hairs of *Eucalyptus globulus*. *Protoplasma*, 231:83–88.

Delhaize, E., Ryan, P.R. (1995) Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiology*, 107:315-321.

Dell, B., Malajczuk, N., Bougher, N.L., Thomson, G. (1994) Development and function of Pisolithus and Escleroderma ectomycorrhizas formed *in vivo* with Allocasuarina, Casuarina and Eucalyptus. *Mycorrhiza*, 5:129-138.

Della-Cioppa, G. Della-Cioppa, S. Garger Jr., Sverlow, G. G., Turpen, T. H., Grill, L. K., Chedekal, M. R. (1998) Melanin production by streptomyces. Int. C12P 017/14; A61K 007/44, U. S. n. 5,814,495.

Ditengou, F.A., Béguiristain, T., Lapeyrie, F. (2000) Root hair elongation is inhibited by hypaphorine, the indole alkaloid from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, and restored by indole-3-acetic acid. *Planta*, 211:722-728.

Ditengou, F.A., Raudaskoski, M., Lapeyrie, F. (2003) Hypaphorine, an indole-3-acetic acid antagonist delivered by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, induces reorganisation of actin and the microtubule cytoskeleton in *Eucalyptus globulus* ssp *bicostata* root hairs. *Planta*, 218:217–225.

Dobbss, L.B., Canellas, L.P., Olivares, F.L., Aguiar, N.O., Peres, L.E.P., Azevedo, M., Spaccini, R., Piccolo, A., Façanha, A.R. (2010) Bioactivity of Chemically Transformed Humic Matter from Vermicompost on Plant Root Growth. *J. Agric. Food Chem.*, 58:3681–3688.

Dobbss, L.B., Medici, L.O., Peres, L.E.P., Pino-Nunes, L.E., Rumjanek, V.M., Façanha, A.R., Canellas, L.P. (2007) Changes in root development of Arabidopsis promoted by organic matter from oxisols. *Annals of Applied Biology*, 151:199-211.

Dueié, T., Parladé, J., Polee, A. (2008) The influence of the ectomycorrhizal fungus *Rhizopogon subareolatus* on growth and nutrient element localisation in two varieties of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *glauca*) in response to manganese stress. *Mycorrhiza*, 18:227-239.

Echart, C.L., Cavalli-Molina, S. (2001) Fitotoxicidade do alumínio, efeitos, mecanismo de tolerância e seu controle genético. *Ciência Rural*, 31:531-541.

Eisenman, H.C., Nosanchuck, J.D., Webber, J.B.W., Emerson, R.J., Casemano, T.A., Casadevall, A. (2005) Microstructure of cell-wall associated melanin in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Biochemistry*, 44:3683–3693.

Façanha, A.R., De Meis, L. (1995) Inhibition of Maize Root H⁺-ATPase by Fluoride and Fluoroaluminate Complexes. *Plant Physiology*, 108: 241-246.

Façanha, A.R., Façanha, A.L.O., Olivares, F.L., Guridi, F., Santos, G.A., Velloso, A.C.X., Rumjanek, V.M., Brasil, F., Schripsema, J., Braz-Filho, R., Oliveira, M.O., Canellas, L.P. (2002) Bioatividade de ácidos húmicos, efeito sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37:1301-1310.

Façanha, A.R., Okorokova-Façanha, A. (2002) Inhibition of Phosphate Uptake in Corn Roots by Aluminum-Fluoride Complexes. *Plant Physiology*, 129:1763–1772.

Faria, R. O. (2004) Avaliação do potencial biotecnológico de *Lentinula boryana* (BERK & MONT) PEGLER. Tese (Mestrado em Bioquímica) – Curitiba – PR, Universidade Federal do Paraná – UFPR, 102p.

Faria, R.O. (2008) Análise de polissacarídeos e tirosinase de *Lentinula boryana* (BERK & MONT) PEGLER: Um macrofungo com potencial biotecnológico. Dissertação (Doutorado em Bioquímica) - Curitiba – PR, Universidade Federal do Paraná – UFPR, 340p.

Felix, C.C., Hyde, J.S., Sarna, T., Sealy, R.C. (1978) Interactions of melanin with metal ions. Electron spin resonance evidence for chelate complexes of metal ions with free radicals. *American Chemical Society*, 100:3922-3926.

Felten, J., Kohler, A., Morin, E., Bhalerao, R.P., Palme, K., Martin, F., Ditengou, F.A., Legué, V. (2009) The Ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* stimulates

lateral root formation in poplar and arabidopsis through auxin transport and signaling. *Plant Physiology*, 151:1991-2005.

Felten, J., Legué, V., Ditengou, F.A. (2010) Lateral root stimulation in the early interaction between *Arabidopsis thaliana* and the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *Plant Signaling & Behavior*, 5:864-867.

Fiske, C.F.; Subbarow, Y. (1925) The colorometric determination of phosphorus.

Fogarty, R.V., Tobin, J.M. (1996) Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzyme and Microbial Technology*, 19:311-317.

Foy, C.D., Chaney, R.L., White, M.C. (1978) The physiology of metal toxicity in plants. *Annuals Reviews of Plant Physiology*, 29:511-566.

Frankenberger, W.T., Poth, M. (1987) Biosynthesis of Indole-3-Acetic Acid by the Pine Ectomycorrhizal Fungus *Pisolithus tinctorius*. *Applied and Environmental Microbiology*, 53:2908-2913.

Franzen, A.J., Cunha, M.M.L., Miranda, K., Hentschel, J., Plattner, H., Silva, M.B., Salgado, C.G., Souza, W., Rozental, S. (2008) Ultrastructural characterization of melanosomes of the human pathogenic fungus *Fonsecaea pedrosoi*. *Journal of Structural Biology*, 162:75–84.

Frederick, B.A., Caesar-Tonthat, T.C., Wheeler, M.H., Sheehan, K.B., Edens, W.A., Henson, J.M. (1999) Isolation and characterisation of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* melanin mutants. *Mycological Research*, 103:99-110.

Frías, I., Caldeira, M.T., Perez, C.J.R., Navarro, A.J.P., Culianez, M.F.A., Kuppinger, O., Stransky, H., Pages, M., Hager, A., Serrano, R. (1996) A major isoform of the maize plasma membrane H⁺-ATPase: Characterization and induction by auxin in coleoptiles. *The Plant Cell* 8:1533-1544.

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

Fukaki, H., Tasaka, M. (2009) Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Mol. Biol.*, 69:437–449.

Gadd, G.M. (1983) The use of solid medium to study effects of cadmium, copper and zinc on yeasts and yeast-like fungi: applicability and limitations. *Journal of Applied Microbiology*, 54:57–62.

Gadd, G.M. (1993) Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist.*, 124:25-60.

Galli, U., Schüepp, H., Brunold, C. (1994) Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. *Physiologia Plantarum*, 92:364–368.

Gan, E.V., Haberman, H.B., Menon, I.A. (1976) Electron transfer properties of melanin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 173:666-672.

Gao, Y., Xiao-qin, W., Min-qin, S. (2009) Effects of ectomycorrhizal seedlings of masson pine on absorption and utilization of N,P and K. *Journal of Nanjing Forestry University*, 4:77-80.

Gianinazzi-Pearson, V., Bonfante-Fasolo, P., Dexheimer, J. (1986) Ultrastructural studies of surface interactions during adhesion and infection by ericoid endomycorrhizal fungi. In: *Recognition in Microbe-Plant Symbiotic and Pathogenic Interactions. NATO ASI Series, H4* (Ed. by B. Lugtenberg), pp. 273-282. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Giannini J.L.; Briskin D.P. (1987) Proton transport in plasma membrane and tonoplast vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue. *PlantPhysiol.* 84: 613.

Goffeau, A., Slayman, C.W. (1981) The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, 639:197-223.

Gospadaryov, D., Lushchack, V. (2011) Some properties of melanin produced by *Azotobacter chroococcum* and its possible application in biotechnology. *БИОТЕХНОЛОГИЯ*, 4:61-69.

Grazziotti, P.H., Siqueira, J.O., Moreira, F.M., Carvalho, D. (2001) Tolerância de fungos ectomicorrízicos a metais pesados em meio de cultura adicionado de solo contaminado. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, 25:839-848.

Guerinot, M.L. (2000) The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465:190-198.

Hager, A., Debus, G., Edel, H.G., Stransky, H., Serrano, R. (1991) Auxin induces exocytosis and rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H⁺-ATPase. *Planta*, 185:527-537.

Hager, A., Henzel, H., Krauss, A. (1971) Versuche und Hypothese zur Primarwirkung des Auxins beim Streckungswachstum. *Planta*, 18:47- 75.

Hall, J.L. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53:1-11.

Hamilton, A.J., Gomez, B.L. (2002) Melanins in fungal pathogens. *Journal Medicinal Microbiology*, 51:189-191.

Hamilton, A.J., Good, A.G., Taylor, G.J. (2001 A) Induction of vacuolar ATPase and mitochondrial ATP synthase by aluminum in an aluminum-resistant cultivar of wheat. *Plant Physiology*, 125:2068–2077.

- Hamilton, A.J., Good, A.G., Taylor, G.J. (2001 B) Vacuolar H⁺-ATPase, but not mitochondrial F₁F₀-ATPase, is required for aluminum resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 205:231-236.
- Harki, E., Talou, T., Dargent, R. (1997) Purification, characterisation and analysis of melanin extracted from *Tuber melanosporum* Vitt. *Food Chemistry*, 58:69-73.
- Harms, H., Schlosser, D., Wick, L.Y. (2011) Untapped potential exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nature*, 9:177-192.
- Hartley, J., Cairney, J.W.G., Meharg, A.A. (1997) Do ectomycorrhizal fungi exhibit adaptive tolerance to potentially toxic metals in the environment. *Plant and Soil*, 189:303-319.
- Henson, J.M., Butler, M.J., Day, A.W. (1999) The dark side of the mycelium - melanins of phytopathogenic fungi. *Annuals Reviews of Phytopatology*, 37:447-471.
- Hentschel, E., Godbold, D.L., Marschener, P., Schlegel, H., Jentschke G. (1993) The effect of *Paxillus involutus* Fr. on aluminum sensitivity of Norway spruce seedling. *Tree Physiology*, 12:379-390.
- Horan, D.P., Chilvers, G.A., Lapeyrie, F.F. (1988) Time sequence of the infection process in eucalypt ectomycorrhizas. *New Phytologist*, 109:451-458.
- Howard, R.J., Valent, B. (1966) Breaking and entering host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annuals Review of Microbiology*, 50:491-512.
- Hua, L., Huang, J. (2011) Aluminum Resistance and Mechanisms of Ectomycorrhizal Fungi. *Guizhou Agricultural Sciences*, 7:85-91.
- Huffnagle, G.B., Chen, G.H., Curtis, J.L., McDonald, R.A., Strieter, R.M., Toews, G.B. (1995) Down-regulation of the afferent phase of T cell mediated pulmonary

inflammation and immunity by a high melanin-producing strain of *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol.*, 155:3507-3516.

Ikeda, R., Sugita, T., Jacobson, E.S., Shinoda, T. (2002) Laccase and melanization in clinically important *Cryptococcus* species other than *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40:1214-1218.

Imhof, S. (2009) Arbuscular, ecto-related, orchid mycorrhizas—three independent structural lineages towards mycoheterotrophy: implications for classification?. *Mycorrhiza*, 19:357–363.

Jacobson, E.S. (2000) Pathogenic roles for fungal melanins. *Clinical Microbiology Reviews*, 13:708-717.

Jansa, J., Finlay, R., Wallander, H., Smith, F.A., Smith, S.E. (2011) Role of Mycorrhizal Symbioses in Phosphorus Cycling. *Soil Biology*, 100:137-168.

Karabaghli-Degron, C., Sotta, B., Bonnet, M., Gay, G., Le Tacon, F. (1998) The auxin transport inhibitor 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) inhibits the stimulation of *in vitro* lateral root formation and the colonization of the tap-root cortex of Norway spruce (*Picea abies*) seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *New Phytologist*, 140:723–733.

Khan, A.G., Kuek, C., Chaudhry, T.M., Khoo, C.S., Hayes, W.J. (2000) Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere*, 41:197-207.

Kieliszewska-Rokicka, B., Rudawska, M., Leski, T., Kurczynska, E.U. (1998) Effect of low pH and aluminium on growth of *Pinus sylvestris* L. Seedlings mycorrhizal with *Suillus luteus*. *Chemosphere*, 36:751-756.

Kim, Y., Park, W., Nian, H., Sakasi, T., Ezaki, B., Jang, Y., Chung, G., Bae, H., Ahn, S. (2010) Aluminum tolerance associated with enhancement of plasma membrane H⁺-ATPase in the root apex of soybean. *Soil Science and Plant Nutrition*, 56:140–149.

Kinraide, T.B. (1988) Proton extrusion by wheat roots exhibiting severe aluminum toxicity symptoms. *Plant Physiology*, 88:418–423.

Kinraide, T.B. (1991) Identity of the rhizotoxic aluminum species. *Plant and Soil*, 134:167-178.

Kochian, L.V. (1995) Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annuals Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 46:237-260.

Kornberg, A., Rao, N.N, Ault-Riché, D. (1999) Inorganic Polyphosphate: A Molecule of Many Functions. *Annual Review of Biochemistry*, 68: 89-125.

Koroleva, O.V., Kulikova, N.A., Alekseeva, T.N., Stepanova, E.V., Davidchik, V.N., Belyaeva, E.Yu., Tsvetkova, E.A. (2007) A Comparative Characterization of Fungal Melanin and the Humin-like Substances Synthesized by *Cerrena máxima* 0275. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43:61–67.

Koshla, B., Kaur, H., Reddy, M.S. (2009) Influence of ectomycorrhizal colonization on the growth and mineral nutrition of *Populus deltoids* under Aluminum toxicity. *Journal of Plant Interactions*, 4:93-99.

Krugner, T.L., Filho, M.T. Tecnologia de inoculação micorrízica em viveiro de *Pinus spp.* Piracicaba: IPEF, 1979. 5p. (Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais. Circular Técnica. 71).

Kubo, Y., Furusawa, I. (1986) Location of melanin in appresoria of *Collectotricium lagenarium*. *Canadian Journal of Microbiology*, 32:280–282.

Lagrange, H., Jay-Allgmand, C., Lapeyrie, F. (2001) Rutin, the phenolglycoside from eucalyptus root exudates, stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentrations. *New Phytologist*, 149:349-355.

- Landeweert, R., Hoffland, E., Finlay, R.D., Kuyper, T.W., Breemen, N.V. (2001) Linking plants to rocks: Ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *TRENDS in Ecology & Evolution*, 16:248-254.
- Langfelder, K., Streibel, M., Jahn, B., Haase, G., Brakhage, A.A. (2003) Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 38:143-158.
- Lapeyrie, F., Ranger, J., Vairelles, D. (1991) Phosphate solubilizing activity of ectomycorrhizal fungi *in vitro*. *Canadian Journal of Botany*, 69:342-346.
- Lapina, V.A., Dontsov, A.E., Ostrovskiĭ, M.A., Emanuél, N.M. (1985) Interaction of oxygen anion radicals with eye melanins and ommochromes. *Doklady Akademii Nauk*, 280:1463-1465.
- Larsson, B., Tjälve, H. (1978) Studies on the melanin-affinity of metal ions. *Acta Physiologica Scandinavica* 104:479–484.
- Le Quéré, A., Wright, D.P., Söderström, B., Tunlid, A., Johansson, T. (2005) Global patterns of gene regulation associated with the development of ectomycorrhiza between Birch (*Betula pendula* Roth.) and *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18:659–673.
- Lei, J., Lapeyrie, F., Malajczuk, N., Dexheimer, J. (1990) Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch on roots of *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake *in vitro*. *New Phytologist*, 116:115-122.
- Lin, W. (1984) Further characterization of the transport property of plasmalemma NADH oxidation system in isolated corn root protoplasts. *Plant Physiology*, 74:219-222.
- Lobão, F.A., Façanha, A.R., Okorokov, L.A., Dutra, K.R., Okorokova-Façanha, A.L. (2007) Aluminum impairs morphogenic transition and stimulates H⁺ transport

mediated by the plasma membrane H⁺-ATPase of *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol.Lett.* 274:17–23.

Maeshima, M., Nakanishi, Y., Matsuura-Endo, C., Tanaka, Y., (1996) Proton pumps of the vacuolar membrane in growing plant cells. *Journal of Plant Research*, 109:119-125.

Marré, M.T., Moroni, A., Albergoni, F.G., Marré, E. (1988) Plasmalemma redox activity and H⁺ extrusion. *Plant Physiology*, 87:25-29.

Marschener P., Klam, A., Jentschke G., Godbold, D.L. (1999) Aluminium and lead tolerance in ectomycorrhizal fungi. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 162:281-286.

Martin, F., Duplessis, S., Ditengou, F., Lagrange, H., Voiblet, C., Lapeyrie, F. (2001) Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis signals and communication genes. *New Phytologist*, 151:145-154.

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

Marx, D.H. (1969) The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*, 59:153-163.

Matsumoto, H. (1988) Inhibition of proton transport activity of microsomal membrane vesicles of barley roots by aluminium. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 34:499-506.

Matsumoto, H., Hirasawa, E., Torikai, H., Takahoshi, E. (1976) Localization of absorbed aluminum in pea root and its binding to nucleic acids. *Plant Cell Physiol.*, 17:127–137.

Matzner, E., Prenzel, J. (1992) Acid deposition in the German Solling area: Effects on soil solution chemistry and Al mobilization. *Water, Air and Soil Pollution*, 61:221-234.

McGraw, K.J. (2003) Melanins, metals, and mate quality. *Oikos*, 102: 402-406.

McQueen Mason, S., Durachko, D.M., Cosgrove, D.J. (1992) Two Endogenous Proteins That Induce Cell Wall Extension in Plants. *The Plant Cell*, 4:1425-1433.

Morré, D.J. (1970) Auxin effects on the aggregation and heat coagulability of cytoplasmic proteins and lipoproteins. *Physiol. Plant*, 23:38-50.

Morré, D.J., Navas, P., Penel, C., Castillo, F.J. (1986) Auxin-Stimulated NADH Oxidase (Semi-dehydroascorbate Reductase) of Soybean Plasma Membrane: Role in Acidification of Cytoplasm?. *Protoplasma*, 133:195-197.

Morsomme, P.; Boutry, M. (1999) The plant membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465:1-16.

Murphy, R. J., Levy, J. F. (1983) Production of copper oxalate by some copper tolerant fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 81:165-168.

Nagai, M., Kawata, M., Watanabe, H., Saito, M.O.K., Takesawa, T., Kanda, K., Sato, T. (2003) Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis. *Microbiology*, 149:2455-2462.

Nardi, S., Concheri, G., Pizzeghello, D., Sturaro, A., Rella, R., Parvoli, G. (2000) Soil organic matter mobilization by root exudates. *Chemosphere*, 41:653-658.

Nehls, U., Beguiristain, T., Ditengou, F., Lapeyrie, F., Martin, F. (1998) The expression of a symbiosis regulated gene in eucalypt roots is regulated by auxins and hypaphorine, the tryptophan betaine of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. *Planta*, 207:296-302.

Nosanchuck, J.D., Casadevall, A. (2003) The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cellular Microbiology*, 5:203-223.

Nurudeen, T.A., Ahearn, D.G. (1979) Regulation of melanin production by *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 10:724-729.

Okorokov, L.A., Kulakovskaya, T.V., Lichko, L.P., Polorotova, E.V. (1985) H⁺ ion antiport as the principal mechanism of transport systems in the vacuolar membrane of the yeast *Saccharomyces carlsbergensis*. *Federation of European Biochemical Societies*, 192:303-306.

Okorokov, L.A., Lehle, L. (1998) Ca²⁺-ATPases of *Saccharomyces cerevisiae*: diversity and possible role in protein sorting. *FEMS Microbiology Letters*, 162:83-91.

Osonubi, O., Mulongoy, K., Awotoye, O.O., Atayese, M.O., Okali, D.U.U. (1991) Effects of ectomycorrhizal and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on drought tolerance of four leguminous woody seedlings. *Plant and Soil*, 136: 131-143.

Parniske, M. (2008) Arbuscular mycorrhiza-the mother of plant root endosymbioses. *Nature*, 6:763-775.

Peterson, R.L., Massicotte, H.B., Melville, L.H. (2004) Mycorrhizas: Anatomy and cell biology. London: NRC Research Press. 173p.

Piatelli, M., Fattorusso, E., Nicolaus, R.A., Magno, S. (1965) The structure of melanins and melanogenesis-V ustilagomelanin. *Tetrahedron*, 21:3229-3236.

Pirt, S.J., Rowley, B.I. (1969) Melanin Production in *Aspergillus nidulans*. *Biochemical Journal*, 114:9–10.

Ramsay, L.M., Gadd, G.M. (1997) Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in vacuolar function confirm a role for the vacuole in toxic metal ion detoxification.

Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters, 152:293-298.

Rauser, W. E. (1999) Structure and function of metal chelators produced by plants – the case for organic acids, amino acids, phytin and metallothioneins. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 31:19-48.

Ray, P., Tiwari, R., Gangi Reddy, U., Adholeya, A. (2005) Detecting the heavy metal tolerance level in ectomycorrhizal fungi *in vitro*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21:309–315.

Rayle, D., Cleland, R.E. (1970) Enhancement of wall loosening and elongation by acid solutions. *Plant Physiology*, 46: 250-253.

Rayle, D.L., Cleland, R. (1972) In-vitro acid-growth response-relation to in-vivo growth responses and auxin action. *Planta*, 104:282-296.

Rayle, D.L., Cleland, R.E. (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*, 99:1271–1274.

Rea, P.A., Sanders, D. (1987) Tonoplast energization: Two H⁺ pumps, one membrane. *Physiologia Plantarum*, 71:131-141.

Rehnstrom, A.L., Free, S.J. (1996) The isolation and characterization of melanin deficient mutants of *Monilinia fructicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49:321-330.

Rensing, C., Ghosh, M., Rosen, B.P. (1999) Families of soft metal ion transporting ATPases. *Journal of Bacteriology*, 181:5891-5897.

Riley, P.A. (1997) Melanin. *Int Journal biochemical Cell Biology*, 29:1235-1239.

- Romero-Martinez, R., Wheeler, M., Guerrero-Plata, A., Rico, G., Torres-Guerrero, H. (2000) Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infection and Immunity*, 68:3696-3703.
- Rosas, A.L., Casadevall, A. (1977) Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 153:265-272.
- Rowley, B.I., Pirt, S.J. (1972) Melanin production by *Aspergillus nidulans* in batch and chemostat cultures. *Journal of General Microbiology*, 72:553-563.
- Rubistein, B., Luster, D.G. (1993) Plasma membrane redox activity: Components and role in plant processes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 44:131-55.
- Saiz-Jimenez, C., Shafizadeh, F. (1984) Iron and copper binding by fungal phenolic polymers an electron spin resonance study. *Current Microbiology*, 10:281-286.
- Sakaguchi.T., Nakajima, A. (1987) Accumulation of uranium by biopigments. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 4:133-141.
- Santos, M.L. (2007) Composição da parede celular dos fungos ectomicorrízicos *Pisolithus microcarpus* e *Pisolithus tinctorius*. Tese (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Viçosa – MG, Universidade Federal de Viçosa – UFV, 64p.
- Senesi, N., Miano, T.M., Martin, J.P. (1987) Elemental, functional infrared and free radical characterization of humic acid-type fungal polymers (melanins). *Biology and Fertility of Soils*, 5:120-125.
- Shao, Z., Sun, F. (2007) Intracellular sequestration of manganese and phosphorus in a metal-resistant fungus *Cladosporium cladosporioides* from deep-sea sediment. *Extremophiles*, 11:435–443.

Shen, H., He, L.F., Sasaki, T., Yamamoto, Y., Zheng, S.J., Ligaba, A., Yang, X.L., Ahn, S.J., Yamaguchi, M., Sasakawa, H., Matsumoto, H. (2005) Citrate secretion coupled with the modulation of soybean root tip under aluminum stress. *Plant Physiology*, 138:287-296.

Shepherd, V.A., Orlovich, D.A., Ashford, A.E. (1993 A) A dynamic continuum of pleiomorphic tubules and vacuoles in growing hyphae of a fungus. *Journal of Cell Science*, 104:495-507.

Shepherd, V.A., Orlovich, D.A., Ashford, A.E. (1993 B) Cell-to-cell transport via motile tubules in growing hyphae of a fungus. *Journal of Cell Science*, 105:1173-1178.

Shoham, S., Levitz, S.M. (2005) The immune response to fungal infections. *British Journal of Haematology*, 129:569–582.

Silva, E.E., Resck, D.V.S., Corazza, E.J., Vivaldi, L. (2004) Carbon storage in clayey Oxisol cultivated pastures in the “Cerrado” region, Brazil. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 103:357-363.

Silva, I.R., Smyth, J., Moxley, D.F., Carter, T.E., Allen, N.S., Rufty, T.W. (2000) Aluminum accumulation at nuclei of cells in the root tip: fluorescence detection using lumogallion and confocal laser scanning microscopy. *Plant Physiology*, 123:543–552.

Silver, S. (1996) Bacterial resistance to toxic metal ions – a review. *Gene*, 179:9-19.

Silver, S., Ji, G. (1994) Newer systems for bacterial resistances to toxic heavy metals. *Environmental Health Perspectives*, 102:107-113.

Singaravelan, N., Grishkan, I., Beharav, A., Wakamatsu, K. Ito, S., Nevo, E. (2008) Adaptive melanin response of the soil fungus *Aspergillus niger* to UV radiation stress at “evolution canyon”, mount carmel, Israel. *PLoS ONE*, 3:1-5.

Sivaguru, M., Baluska, F., Volkmann, D., Felle, H.H., Horst, W.J. (1999) Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex. Short-term effects on the distal part of the transition zone. *Plant Physiology*, 119:1073-1082.

Slankis, V. (1973) Hormonal relationships in mycorrhizal development. In: Marks GC, Kozlowski TT, editors. *Ectomycorrhizae: Their ecology and physiology*. Academic Press: New York. p. 231–298.

Smith, S.E., Read, D.J. (1997) *Mycorrhizal Symbiosis*. 2. ed. London: Academic Press, 605p.

Smith, S.E., Read, D.J. (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*. 3. Ed. London: Academic Press, 787p.

Splivallo, R., Fischer, U., Gobel, C., Feussner, I., Karlovsky, P. (2009) Truffles regulate plant root morphogenesis via the production of auxin and ethylene. *Plant Physiologist*, 150:2018–2029.

Stainsack, J., Mangrich, A. S., Maia, C.M.B.F., Machado, V.G., Dos Santos, J.C.P., Nakagaki, S. (2003) Spectroscopic investigation of hard and soft metal binding sites in synthetic melanin. *Inorganica Chimica Acta*, 356:243-248.

Stepanova, A.N., Yun, J., Likhacheva, A.V., Alonso, J.M. (2007) Multilevel interactions between ethylene and auxin in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 19:2169–2185.

Stussi, H., Rast, D.M. (1981) The biosynthesis and possible function of γ -glutaminy-4-hydroxybenzene in *Agaricus bisporus*. *Phytochemistry*, 20:2347-2352.

Sumons, P.C., Van Den Briel, W., Bienfait, H.F. (1984) Cytosolic NADPH is the electron donor for extracellular Fe^{III} reduction in iron-deficient bean roots. *Plant Physiology*, 75:219-221.

Sun, J., Xu, Y., Ye, S., Jiang, H., Chen, Q., Liu, F., Zhou, W., Chen, R., Li, X., Tietz, O., Wu, X., Cohen, J.D., Palme, K., Li, C. (2009) Arabidopsis ASA1 is important for jasmonate-mediated regulation of auxin biosynthesis and transport during lateral root formation, *The Plant Cell*, 21:1495–1511.

Sylvia, D.M., Sinclair, W.A. (1983) Phenolic compounds and resistance to fungal pathogens induced in primary roots of Douglas-Fir seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *Phytopathology*, 73:390-397.

Sze, H. (1985) H⁺-translocating ATPases: Advances using membrane vesicles. *Annual Review of Plant Physiology*, 36:175–208.

Tagu, D., Lapeyrie, F., Martin, F. (2002) The ectomycorrhizal symbiosis genetics and development. *Plant and Soil*, 244:97-105.

Taiz, L. (1992) The Plant Vacuole. *Journal of Experimental Biology*, 172:113-122.

Taiz, L., Zeiger, E. 2002. *Plant Physiology*. 3.ed. Sinauer, 690p.

Takahashi, K., Hayashi, K., Kinoshita, T. (2012) Auxin activates the plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation during hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 159:632-641.

Tam, P.C.F. (1995) Heavy metal tolerance by ectomycorrhizal fungi and metal amelioration by *Pisolithus tinctorius*. *Mycorrhiza*, 5:181-187.

Targhetta, B. L. Tolerância de fungos ectomicorrízicos e plantas associadas a níveis tóxicos de metais. Florianópolis: UFSC, 2008. 50 p. Trabalho de conclusão de curso.

Tavares, T.M., Carvalho, F.M. (1992) Avaliação da exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente, exemplos do recôncavo baiano. *Química Nova*, 15:147-154.

Tillard, P., Bousquet, N., Mousain, D., Martin, F., Salsac, L. (1989) Polyphosphatase activities in the soluble fraction of mycelial homogenates of *Pisolithus tinctorius*. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 28: 525–528.

Tode, K., Luthen, H., (2001) Fusicoccin and IAA-induced elongation growth share the same pattern of K⁺ dependence. *Journal of Experimental Botany*, 52:251-255.

Van Tichelen, K.K., Colpaert, J.V., Vangrosveld, J. (2001) Ectomycorrhizal protection of *Pinus sylvestris* against copper toxicity. *New Phytologist*, 150:203-213.

Van Woert, M.H. (1968) Oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide by melanin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 129:165-171.

Vare, H. (1990) Aluminium polyphosphate in the ectomycorrhizal fungus *Suillus variegatus* (Fr.) O. Kunze as revealed by energy dispersive spectrometry. *New Phytologist*, 116:663-668.

Vázquez, M.D., Poschenrieder, C., Corrales, I., Barceló, J. Change in apoplastic. (1999) Al during the initial growth response to Al by roots of a resistant maize variety. *Plant physiology*, 119:435-444.

Volnova, A.I., Mirchink, T.G., (1972) Fractionation of darkcolored fungi containing a green fraction. *Soviet Soil Science*, 11:140–145.

Wang, Y., Casadevall, A. (1994) Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-dopa decreases its susceptibility to amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemotherap.*, 38:2646-2650.

Weisman, L.S., Wickner, W. (1988) Intervacuole exchange in the yeast zygote: A new pathway in organelle communication. *Science* 241, 589-591.

Wheeler, M.H., Bell, A.A. (1988) Melanins and their importance in pathogenic fungi. *Curr. Top. Med. Mycol.*, 2:338-387.

White, N.A., Boddy, L. (1992) Extracellular enzyme localization during interspecific fungal interactions. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 98:75-80.

Williams, L.E., Pittman, J.K., Hall, J.L. (2000) Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 77803:1-23.

Yan, F., Feuerle, R., Schaffer, S., Fortmeier, H., Schubert, S. (1998) Adaptation of active proton pumping and plasmalemma ATPase activity of corn roots to low root medium pH. *Plant Physiology*, 117:311–319.

Yan, F., Schubert, S., Mengel, K. (1992) Effect of low root medium pH on net proton release, root respiration, and growth of corn (*Zea mays* L.) and broad bean (*Vicia faba* L.). *Plant Physiology*, 99:415–421.

Yang, J.L., Zhu, X.F., Peng, Y.X., Zheng, C., Ming, F., Zheng, S.J. (2011) Aluminum regulates oxalate secretion and plasma membrane H⁺-ATPase activity independently in tomato roots. *Planta*, 234:281-291.

Zaprometova, K.M., Mirchink, T.G., Orlov, D.S., Yukhnin, A.A. (1971) Characteristics of black pigments of the darkcolored soil fungi. *Soviet Soil Science*, 7:22–30.

Zavgorodnyaya, Y.A., Demin, V.V., Kurakov, A.V. (2002) Biochemical degradation of soil humic acids and fungal melanins. *Organic Geochemistry*, 33:347-355.

Zhang, G., Taylor, G.J. (1990) Kinetics of aluminum uptake in *Triticum aestivum* L. *Plant Physiology*, 94:577-584.

Zhang, W., Zhang, F., Shen, Z., Liu, Y. (1998) Changes of H⁺ pumps of tonoplast vesicle from wheat roots *in vivo* and *in vitro* under aluminum treatment and effect of calcium. *Journal of Plant Nutrition*, 21: 2515–2526.

Zviagintsev, D.G., Mirchink, T.G. (1986) On the nature of soil humic acids. *Soviet Soil Science*, 5:68–75.