

**MELANINA FÚNGICA ATUA NA SINALIZAÇÃO DE ADAPTAÇÕES  
PRÉ-SIMBIÓTICAS PARA A INTERAÇÃO PLANTA-FUNGO  
ECTOMICORRÍZICO**

**AMANDA AZEVEDO BERTOLAZI**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
OUTUBRO - 2016**

**MELANINA FÚNGICA ATUA NA SINALIZAÇÃO DE ADAPTAÇÕES  
PRÉ-SIMBIÓTICAS PARA A INTERAÇÃO PLANTA-FUNGO  
ECTOMICORRÍZICO**

**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 Doutor em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Arnaldo Rocha Façanha

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
OUTUBRO – 2016

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCT / UENF

10/2017

Bertolazi, Amanda Azevedo

Melanina fúngica atua na sinalização de adaptações pré-simbióticas para a interação planta-fungo ectomicorrízico / Amanda Azevedo Bertolazi. – Campos dos Goytacazes, 2016.

104 f. : il.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) -- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Melhoramento e Genética Vegetal. Campos dos Goytacazes, 2016.

Orientador: Arnaldo Rocha Façanha.

Área de concentração: Produção vegetal.

Bibliografia: f. 79-99.

1. SIMBIOSE 2. FLUXOS DE H<sup>+</sup> 3. ATPase 4. PROTEÔMICA 5. CÁLCIO I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Melhoramento e Genética Vegetal II. Título

CDD 631.5233

# **MELANINA FÚNGICA ATUA NA SINALIZAÇÃO DE ADAPTAÇÕES PRÉ-SIMBIÓTICAS PARA A INTERAÇÃO PLANTA-FUNGO ECTOMICORRÍZICO**

**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 Doutor em Produção Vegetal.

Aprovada em 31 de outubro de 2016

Comissão Examinadora:

---

Dr. Clóvis de Paula Santos  
(Medicina Veterinária Parasitologia Veterinária) - UENF

---

Dr. Gustavo Lazzaro Rezende (Biologia Celular e Molecular) - UENF

---

Dr. Zilma Maria Almeida Cruz (Ciências Biológicas) - UVV

---

Dr. Alessandro Coutinho Ramos (Produção Vegetal) - UENF  
Co-Orientador

---

Dr. Arnaldo Rocha Façanha (Química Biológica) – 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. Ao meu pai, pela oportunidade, confiança, carinho e orgulho demonstrado por mim. E ao meu padrasto por todos os ensinamentos, pela confiança e pela amizade inabalável mesmo com todos os percalços da vida;

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 Co-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;

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

Aos amigos Sávio, Antônio e Colodete por toda a ajuda com os experimentos, pela amizade e pelos diversos momentos de descontração compartilhados;

Aos amigos do laboratório, pelo ótimo convívio em todos os momentos do meu doutorado;

Aos professores, aos técnicos de laboratório do LBCT e às secretárias da pós-graduação pela atenção e pelo ótimo convívio durante esses anos de doutorado;

À Dr<sup>a</sup>. Natália Aguiar e ao professor Dr. Luciano Pasqualoto Canellas pelas análises de infravermelho e apoio técnico na liofilização do material;

Ao Dr. Vanildo Silveira pela colaboração com as análises proteômicas;

Ao Dr. Frederico Jacob Eutrópio pela realização da análise de PCA;

Aos doutores Zilma Maria, Clóvis de Paula e Gustavo Rezende 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 .....	VII
ABSTRACT .....	IX
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Os pigmentos melânicos .....	4
2.1.1. Características químicas e síntese.....	4
2.1.2. Vantagens da melanização .....	8
2.1.2.1. Virulência.....	11
2.1.3. As melaninas e os ácidos húmicos .....	13
2.2. Micorrizas.....	15
2.2.1. O transporte de nutrientes na simbiose micorrízica .....	20
2.2.1.1. P-H <sup>+</sup> -ATPases .....	21
2.2.1.2. V-H <sup>+</sup> -ATPases e H <sup>+</sup> -PPases.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	26
3.1. Cultura do fungo ectomicorrízico .....	26
3.2. Cultivo do fungo e produção de melanina em meio líquido.....	27
3.3. Extração da melanina .....	27
3.4. Espectro de infravermelho e análise elementar .....	27
3.5. Quantificação da melanina.....	28

3.6. Crescimento das plantas em diferentes concentrações de melanina.....	28
3.7. Medições dos fluxos de H <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> e correntes utilizando o sistema de eletrodos vibráteis íons-seletivos (SIET).....	29
3.8. Avaliação do número de primórdios formadores de raízes laterais .....	31
3.9. Microscopia óptica.....	31
3.10. Obtenção da fração microssomal .....	32
3.10.1. Atividade da hidrólise de ATP das ATPases do tipo P .....	33
3.10.2. Atividade de bombeamento de H <sup>+</sup> das ATPases do tipo P .....	33
3.11. Immunoblotting.....	34
3.12. Análise proteômica.....	34
3.12.1. Extração e quantificação das proteínas totais.....	35
3.12.2. Análise LC-MS/MS.....	35
3.12.3. Bioinformática .....	37
3.13. Análises estatísticas .....	37
4. RESULTADOS .....	39
4.1. Caracterização da melanina .....	39
4.2. Efeitos da melanina no crescimento e morfologia radicular .....	41
4.3. Diferença de voltagem extracelular gerada pelo fluxo de H <sup>+</sup> , direção e intensidade dos fluxos de H <sup>+</sup> e pH da superfície da zona apical de raízes de <i>E. urograndis</i> .....	46
4.4. Diferença de voltagem extracelular de Ca <sup>2+</sup> , fluxos de Ca <sup>2+</sup> e concentração extracelular de Ca <sup>2+</sup> na zona apical de raízes de <i>E. urograndis</i> .....	49
4.5. Medição dos fluxos de H <sup>+</sup> e pH da superfície da zona apical de raízes de <i>E. urograndis</i> na presença de vanadato (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> ) .....	53
4.6. Atividade hidrolítica, atividade de bombeamento de H <sup>+</sup> e expressão das P-H <sup>+</sup> -ATPases isoladas das raízes de <i>E. urograndis</i> .....	55
4.7. Análise de componente principal .....	56
4.8. Análise proteômica das raízes de <i>E. urograndis</i> crescidas com melanina .....	57
5. DISCUSSÃO.....	65
5.1. A melanina exudada pelo fungo <i>P. tinctorius</i> pertence ao tipo DOPA-melanina ....	65
5.2. A morfologia das raízes de <i>E. urograndis</i> é alterada pela melanina de forma similar à induzida pela presença de fungos ectomicorrízicos.....	66
5.3. Inibição da atividade das P-H <sup>+</sup> -ATPases e do fluxo de H <sup>+</sup> pela melanina associada à inibição do sistema radicular .....	67
5.4. Altas concentrações de melanina inibem o fluxo de Ca <sup>2+</sup> e reduzem o Ca <sup>2+</sup> extracelular resultando em alterações morfológicas na raiz .....	68



5.5. A melanina do fungo <i>P. tinctorius</i> regula a expressão de proteínas envolvidas na formação da simbiose ectomicorrízica.....	70
6. RESUMO E CONCLUSÕES.....	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	79
APÊNDICES.....	100
TABELAS SUPLEMENTARES .....	103

## RESUMO

BERTOLAZI, Amanda A. DS – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, outubro de 2016. MELANINA FÚNGICA ATUA NA SINALIZAÇÃO DE ADAPTAÇÕES PRÉ-SIMBIÓTICAS PARA A INTERAÇÃO PLANTA-FUNGO ECTOMICORRÍZICO. Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Rocha Façanha; Co-orientador: Prof. Dr. Alessandro Coutinho Ramos.

Fungos ectomicorrízicos se associam simbioticamente com raízes de plantas florestais. No processo de micorrização ocorre uma intensa troca de metabólitos, que também atuam como sinais necessários à formação da simbiose. Entre os metabólitos produzidos pelo fungo, a melanina é um pigmento comumente associado à proteção física e virulência. Este trabalho estabelece uma nova função da melanina produzida por fungos ectomicorrízicos, na sinalização desta interação simbiótica. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos regulatórios da melanina do fungo *Pisolithus tinctorius* sobre o crescimento, morfologia, fluxo de prótons ( $H^+$ ) e cálcio ( $Ca^{2+}$ ) e no perfil proteico de raízes de *Eucalyptus urograndis*. Foram testadas seis concentrações de melanina in vitro (0, 10, 50, 250, 750 e 1000 mg L<sup>-1</sup>). Um sistema microsonda vibrátil seletiva a íons foi

utilizado para determinar os fluxos de  $H^+$  e  $Ca^{2+}$  na região apical de raízes de *E. urograndis*. Foi realizada a extração de proteínas de raízes de plântulas cultivadas na presença ou não de  $750 \text{ mg L}^{-1}$  de melanina para análises proteômicas em espectrômetro de massa. Os resultados demonstram uma inibição do crescimento radicular em altas concentrações de melanina. Houve também uma inibição da produção de pelos radiculares e alteração na morfologia do ápice radicular em altas concentrações de melanina ( $750$  e  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ). Os fluxos de  $H^+$  e  $Ca^{2+}$  foram similarmente regulados pela melanina, em que altas concentrações deste pigmento inibiram significativamente os fluxos dos dois íons. Uma alcalinização do pH rizosférico e uma redução na concentração de  $Ca^{2+}$  extracelular ocorreram com o incremento das concentrações de melanina no meio. A análise proteômica identificou um total de 1943 proteínas. Dentre essas, 307 proteínas foram diferencialmente expressas, sendo 107 proteínas superexpressadas e 200 proteínas cuja expressão foi menor na presença da melanina em relação ao tratamento  $0 \text{ mg L}^{-1}$ . Entre as proteínas diferencialmente expressas, destacam-se proteínas associadas com respostas a estresses bióticos. Neste grupo encontram-se proteínas relacionadas a crescimento e desenvolvimento celular, mecanismos de defesa da planta, sinalização e metabolismo de hormônios. Outro grupo de destaque foi o de proteínas relacionadas à via glicolítica, em que proteínas responsáveis pela produção de energia foram menos abundantes nas raízes tratadas com melanina. Por fim, a presença deste pigmento também foi responsável pela regulação da expressão funcional da P- $H^+$ -ATPase e de proteínas envolvidas na sua regulação. As mudanças provocadas pela melanina na modulação dos fluxos iônicos transmembranares e na abundância destas proteínas, demonstram que a melanina pode estar agindo como uma molécula sinalizadora durante o desenvolvimento da simbiose ectomicorrízica, facilitando a invasão e colonização da planta pelo fungo, através da inativação dos mecanismos de defesa do hospedeiro, redução do catabolismo de carboidratos e inibição do crescimento do sistema radicular.

## ABSTRACT

BERTOLAZI, Amanda A. DS – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, October 2016. FUNGAL MELANIN ACTS IN THE SIGNALING OF PRE-SYMBIOSIS ADAPTATIONS FOR THE PLANT-ECTOMYCORRHIZAL FUNGI INTERACTION. Advisor: Prof. Dr. Arnaldo Rocha Façanha; Co-advisor: Prof. Dr. Alessandro Coutinho Ramos.

Ectomycorrhizal fungi associate symbiotically with roots of forest plants. In the mycorrhization process there is an intense exchange of metabolites, which also act as signals required for the formation of the symbiosis. Among the metabolites produced by the fungus, melanin is a pigment commonly associated with physical protection and virulence. This work establishes a new function for the melanin produced by ectomycorrhizal fungi, in the signaling of this symbiotic interaction. The objective of this work was to analyze the regulatory effects of a fungal melanin from *Pisolithus tinctorius* on the growth, morphology, protons ( $H^+$ ) and calcium ( $Ca^{2+}$ ) fluxes, and the protein profile of *Eucalyptus urograndis* roots. Six melanin concentrations were tested in vitro (0, 10, 50, 250, 750 e 1000 mg L<sup>-1</sup>). A selective-ion microprobe vibrating system was used to determine the  $H^+$  and  $Ca^{2+}$  fluxes at the apical zone of *E. urograndis* roots. *E. urograndis* root proteins were

extracted from seedlings grown in medium containing or not 750 mg L<sup>-1</sup> of melanin, for proteomics analysis on mass spectrometer. The results demonstrate an inhibition of the root growth. There was also an inhibition of root hair growth and an alteration in the morphology of the root apex in high melanin concentrations (750 and 1000 mg L<sup>-1</sup>). Protons and Ca<sup>2+</sup> fluxes were similarly regulated by melanin, whereas high concentrations of this pigment inhibited significantly the fluxes of both ions. An alkalization of the rhizospheric pH and a reduction of extracellular Ca<sup>2+</sup> concentration occurred with increasing melanin concentrations. The proteomic analysis identified a total of 1943 proteins and among them, 307 proteins were differentially expressed, with 107 proteins up-regulated and 200 proteins down-regulated in the presence of melanin when compared to the control. Among the differentially expressed proteins, some proteins highlighted for being associated with responses to biotic stresses. In this group there were proteins related to cellular growth and development, plant defense mechanisms, signaling and hormone metabolism. Another highlighted group was the proteins related to the glycolytic pathway, which enzymes expression were down-regulated in roots treated with melanin. Finally, the presence of this pigment was also responsible for regulating the functional expression of P-H<sup>+</sup>-ATPase and proteins involved in their regulation. The changes caused by melanin in the modulation of ionic transmembrane fluxes and in the abundance of these proteins, show that melanin may be acting as a signaling molecule during the development of ectomycorrhizal symbiosis, facilitating invasion and colonization of the plant by the fungus, by inactivating the mechanisms of host defense, reduction of the carbohydrate metabolism and inhibition of the root system growth.

## 1. INTRODUÇÃO

As melaninas são pigmentos multifuncionais sintetizados por organismos pertencentes a todos os reinos biológicos. Elas conferem diversas vantagens adaptativas, como proteção contra radiações UV e térmicas, espécies reativas de oxigênio, toxicidade de metais e lise enzimática (Bell e Wheeler, 1986).

Apesar de tal importância e ubiquidade, existem muitas questões fundamentais ainda não respondidas em relação a estes pigmentos, principalmente quanto aos detalhes inerentes à sua complexa estrutura química (Nosanchuk et al., 2015) e à correspondente, e ainda pouco explorada, bioatividade.

Em fungos patogênicos, tanto de plantas como de animais, as melaninas desempenham um importante papel no processo de infecção do hospedeiro, uma vez que aumentam a capacidade de virulência destes organismos (Revankar e Sutton, 2010). Alguns estudos têm relatado que somente apressórios melanizados dos fungos patogênicos *Colletotrichum lindemuthianum*, *Magnaporthe grisea* e *Colletotrichum lagenarium* são capazes de penetrar na célula hospedeira (Kawamura et al., 1997; Wolkow et al., 1983; Takano et al., 1997). Além disso, as melaninas protegem os patógenos microbianos contra mecanismos de defesa da célula hospedeira, através da inibição da resposta de citocinas como as interleucinas e o Fator- $\alpha$  de necrose tumoral (Chai et al., 2010; Zhang et al., 2013).

Desde os primeiros estudos, as melaninas têm sido consideradas similares às substâncias húmicas e apesar de possuírem algumas diferenças estruturais como a presença de compostos fenólicos proeminentes, maior quantidade de N complexo não identificado e características alifáticas após hidrólise ácida (Schnitzer e Chan, 1986), atualmente já é bem aceito que as melaninas apresentam diversas características análogas aos ácidos húmicos, incluindo um mesmo comportamento em termos de solvatação, aminoácidos liberados em hidrólise ácida e baixo conteúdo de polissacarídeos, similar composição elementar, e assinaturas correspondentes nos espectros UV, visível e infravermelho, e na ressonância magnética nuclear (Coelho et al., 1997; Zavgorodnyaya et al., 2002).

As substâncias húmicas estimulam o desenvolvimento vegetal influenciando, diretamente ou indiretamente, diversos processos bioquímicos das plantas, ao invés de funcionar somente como uma potencial fonte de nutrientes. Têm sido estudadas as propriedades bioquímicas das moléculas bioativas que formam a estrutura supramolecular dos ácidos húmicos, relacionadas ao seu efeito do tipo hormonal no desenvolvimento de raízes. Este efeito tem sido relacionado à presença de moléculas com atividade auxínica, as quais promovem uma indução e ativação das bombas de  $H^+$ , podendo estar relacionada ao incremento da área radicular, à promoção da acidificação do apoplasto e ao conseqüente aumento da plasticidade da parede celular, como proposta pela clássica teoria do crescimento ácido (Canellas et al., 2002; Façanha et al., 2002; Nardi et al., 2002; Zandonadi et al., 2007).

Dentre os organismos produtores de melanina estão as ectomicorrizas, definidas por serem associações simbióticas entre fungos do solo e raízes de espécies florestais (Smith e Read, 2008). Entre os diversos benefícios dos fungos ectomicorrízicos para as plantas pode-se destacar o aumento da área de absorção radicular, uma vez que as hifas extraradiciais crescem além da rizosfera, permitindo o maior aproveitamento da água e de nutrientes como P, N e K, resistência ao aumento de temperatura, acidez do solo, estresses hídricos e maior tolerância a patógenos da raiz e substâncias tóxicas presentes no solo (Luo et al., 2013).

No início da formação da simbiose ectomicorrízica, antes mesmo do contato do fungo com a raiz, ocorre uma troca de sinais moleculares na rizosfera

entre o fungo e o hospedeiro, como a exudação de flavonol e rutina pelas raízes e exudação de hifaforina e auxina pelo fungo. Tais compostos provocam mudanças morfológicas no vegetal e nos fungos ectomicorrízicos, porém ainda são limitados os conhecimentos sobre a regulação e a sinalização da interação e colonização desta simbiose (Martin et al., 2001; Garcia et al., 2015).

Já foi demonstrado que os fluxos de  $H^+$  em domínios específicos das hifas do fungo micorrízico arbuscular *Gigaspora margarita* são fortemente influenciados pela disponibilidade de P, sacarose e sinais derivados da raiz hospedeira, fenômeno que parece estar relacionado a uma ativação diferencial das  $H^+$ -ATPases de membrana plasmática, e a um estímulo do crescimento e ramificação das hifas (Ramos et al., 2008).

No caso da associação ectomicorrízica foi relatado que os fluxos de  $H^+$  e ânions de raízes de *Eucalyptus globulus* micorrizadas com o fungo *Pisolithus microcarpus* possuem períodos mais longos do que raízes não micorrizadas, enquanto o fluxo de  $Ca^{2+}$  é completamente extinto na interação fúngica. Tais resultados suportam a teoria de um modelo em progresso no qual a absorção de nutrientes e a estimulação do crescimento vegetal na simbiose ectomicorrízica são mediados pelos fungos, podendo ser pH dependentes (Ramos et al., 2009).

Neste contexto, a hipótese central desta Tese é que a melanina, na simbiose ectomicorrízica, não é dotada apenas de funções relacionadas à proteção física contra efeitos ambientais como radiações, temperatura e moléculas tóxicas, mas também exerce funções regulatórias sobre a energética e a sinalização iônica, modulando respostas morfológicas, bioquímicas e fisiológicas inerentes à formação e ao desenvolvimento desta simbiose. Logo, o objetivo deste trabalho foi elucidar o papel da melanina exudada pelo fungo *Pisolithus tinctorius*, na regulação e/ou sinalização da interação simbiótica fungo-planta.



## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Os pigmentos melânicos**

#### **2.1.1. Características químicas e síntese**

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

Este pigmento é amplamente encontrado na natureza, sendo produzido por plantas, animais, protozoários e microrganismos (d'Ischia et al., 2013). Comumente, a melanina nos animais é sintetizada e mantida em organelas especializadas, os melanossomas, que localizam-se nos melanócitos, e vão facilitar a transferência de melanina para outras células (Raposo e Marks, 2002). Já a melanina dos fungos, pode ser encontrada na parede celular ou pode ser

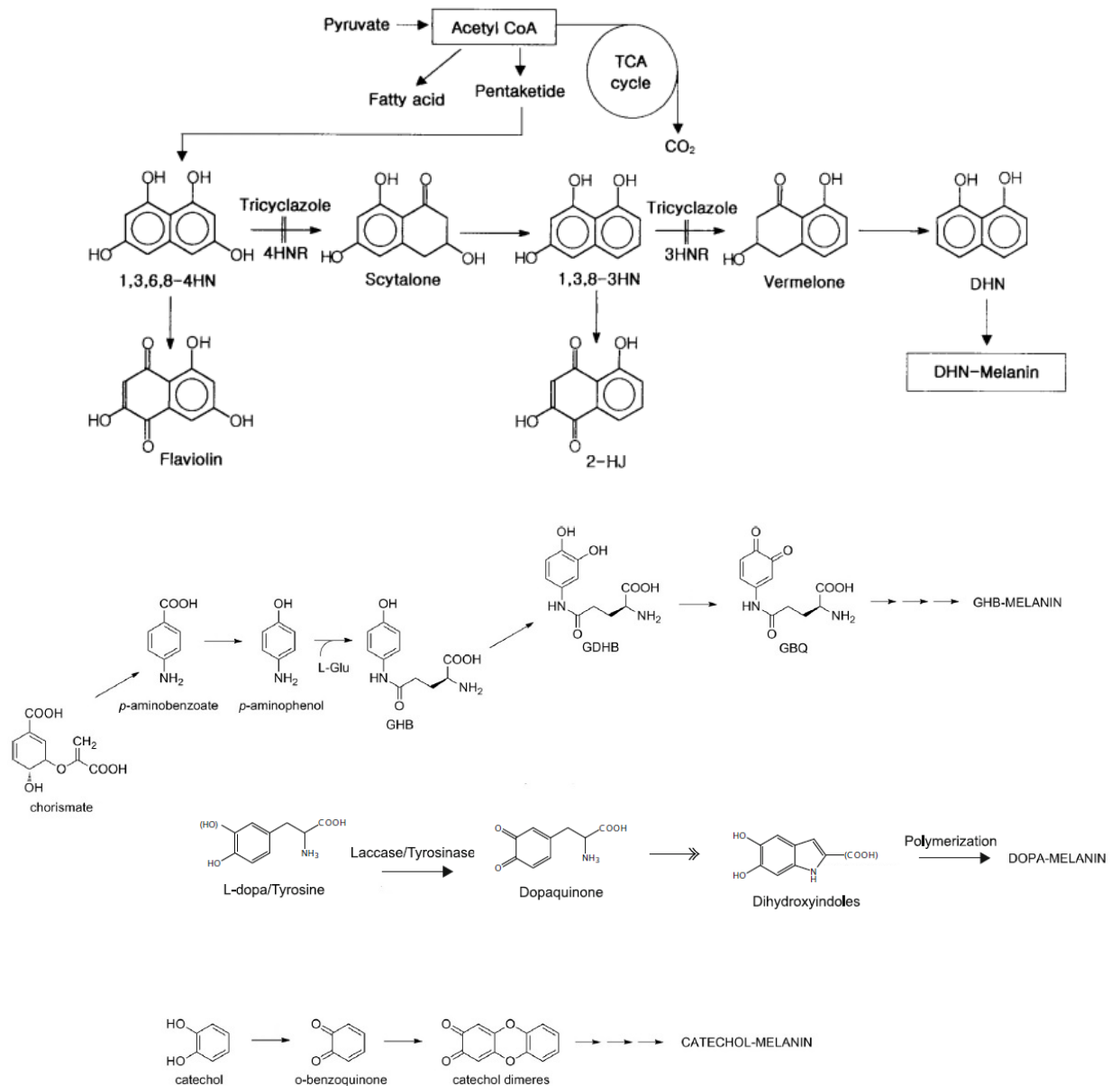
secretada no meio extracelular na forma de polímeros (Yu et al., 2015; Jalmi et al., 2012).

No entanto, Alviano et al. (1991), demonstraram que no fungo *Fonsecaea pedrosoi* a melanina é sintetizada dentro de uma estrutura delimitada por membrana referida como melanossoma. Tal estrutura possui uma matriz fibrosa, similar à encontrada nos melanossomas de anfíbios, funcionando como um sítio de suporte para a deposição de melanina, que é exportada dentro dessa organela para a parede celular e depositada em camadas concêntricas (Franzen et al., 2008). Organelas similares já foram descritas em outros fungos produtores de melanina como *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus* (Walker et al., 2010; Upadhyay et al., 2016).

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 organismo (Nosanchuck e Casadevall, 2003).

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 livres de nitrogênio (Ambrico, 2016).

Em relação às vias biossintéticas da melanina, diversos precursores já foram identificados (Figura 1). Entre eles está o 1,8-dihidroxi-naftaleno (DHN), o qual é sintetizado por ascomycetos e deuteromycetos a partir de pentaquetídeos. Sua descoberta ocorreu a partir do uso de mutantes de *Verticillium dahliae* deficientes em melanina (Puhalla, 1975; Bell et al., 1976). A rota de formação desta melanina inicia-se com a carboxilação do acetil-CoA em malonil-CoA, o qual serve como substrato para formação do pentaquetídeo-CoA que sofre ciclização pela enzima pentaquetídeo sintase, gerando o 1,3,6,8-THN. Este é subsequentemente transformado, por reações de hidratação e desidratação, em scitalone, vermelone e por fim em 1,8-DHN, o qual dará origem à DHN-melanina (Solano, 2014) (Figura 1).



**Figura 1.** Vias biossintéticas da melanina e seus precursores. DHN=1,8-dihidroxi-naftaleno, GHB= $\gamma$ -glutaminil-4-hidroxi-benzeno, GDHB= $\gamma$ -glutaminil-3,4-dihidroxi-benzeno, GBQ= $\gamma$ -glutaminil-3,4-benzoquinona (Adaptado de Lee et al., 2003, Eisenman e Casadevall 2012 e Jolivet al., 1998).

Existem duas moléculas iniciais na via de síntese das DOPA-melaninas, que podem ser a L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) ou a tirosina (Figura 1). Se a L-DOPA for a molécula precursora, ela é oxidada pela enzima laccase em dopaquinona, porém, se a tirosina for a molécula precursora, ela é primeiramente convertida em L-DOPA, para depois se tornar dopaquinona, sendo que as duas reações são catalisadas pela enzima tirosinase. A dopaquinona é adicionada de um grupo amino e produz a ciclodopa, a qual é oxidada para formar o dopacromo. Em seguida, a tautomerização desta molécula forma di-hidroxi-indol (DHI) e ácido DHI carboxílico (DHICA), os quais são polimerizados para formar a DOPA-melanina (Ito et al., 2011; Eisenman e Casadevall, 2012). Este tipo de melanina é comumente encontrado em basidiomicetos, tanto na parede celular como no meio extracelular (Fogarty e Tobin, 1996).

O corismato, que deriva da via do shikimato, é o precursor da GHB-melanina (Figura 1). Este composto, através da ação da 4-aminobenzoato sintase, é convertido em p-aminobenzoato, o qual é convertido em p-aminofenol pela ação da 4-aminobenzoato hidroxilase. Em seguida, a enzima  $\gamma$ -glutaminiltransferase, transforma o p-aminobenzoato em  $\gamma$ -glutaminil-4-hidroxibenzeno (GHB), o qual, pela ação da tirosinase, é convertido em  $\gamma$ -glutaminil-3,4-dihidroxibenzeno (GDHB), e pela ação da mesma enzima vira  $\gamma$ -glutaminil-3,4-benzoquinona (GBQ), que por fim, sofre diversas reações de polimerização para formar a GHB-melanina (Jolivet et al., 1998; Weijn et al., 2013). O GHB ocorre no micélio, no corpo de frutificação do fungo e nos esporos, já o GDHB ocorre apenas nas hifas (Stüssi e Rast, 1981).

O catecol é, também, um provável precursor da melanina (Figura 1). Este substrato já foi encontrado no pigmento isolado de esporos do fungo parasita *Ustilago maydis* (Piattelli et al., 1965), no tecido de cogumelos do fungo *Agaricus bisporus* (Paranjpe et al., 1978), e recentemente, foi demonstrado que a melanina sintetizada pelo basidiomiceto *Rhizoctonia solani* é derivada do catecol (Chen et al., 2015). 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).

### 2.1.2. Vantagens da melanização

Tem se tornado cada vez mais evidente que a capacidade de produzir melanina confere vantagens adaptativas aos organismos que a possuem, consistindo em uma importante barreira aos efeitos deletérios de vários estresses ambientais (Cordero e Casadevall, 2017).

Diversos trabalhos sugerem que o acúmulo de melanina pode fornecer proteção contra calor, frio ou dessecação em alguns fungos (Howard e Valent, 1996; Rehnstrom e Free, 1996; Rosas e Casadevall, 1997). Padrões sazonais da mycobiota do solo do deserto central de Negev em Israel demonstraram que fungos com esporos fortemente melanizados são dominantes na região, tendo sua população aumentada no verão, indicando a sobrevivência destes fungos durante os períodos mais extremos do ano. *Aspergillus fumigatus* e ascomycetos teleomórficos compreenderam a maior parte da mycobiota termotolerante obtida à temperatura de 37 °C (Grishkan e Nevo, 2010).

As rochas de regiões desérticas podem ser o ambiente de maior estresse na superfície terrestre. A superfície exposta das rochas pode atingir temperaturas que variam entre -45 °C e 60 °C, sendo que a radiação infravermelha e ultravioleta é alta, o carbono orgânico é raro e a água pode estar disponível apenas como orvalho ou na forma cristalina sob camadas de neve e gelo (Gorbushina, 2007).

Apesar de todas as intempéries de um ambiente rochoso, um diverso grupo de organismos habita as rochas de desertos e entre eles estão os chamados “fungos pretos” (Sterflinger, 2000), cuja presença já foi relatada nos desertos quentes do Arizona e nos desertos frios da Antártica (Staley et al., 1982; Friedmann et al., 1987). Tais fungos compartilham um número de características universalmente presentes como forte melanização, parede celular grossa e com multicamadas e produção de exopolissacarídeos, resultando na sua extraordinária habilidade de tolerar estresses físicos e químicos (Sterflinger, 2006).

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), *Fonsecaea monophora* (Sun et al., 2011) e *Cladosporium* sp. (Saleh et al., 1988). 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 (Meredith e Sarna, 2006; Solano, 2016).

Singaravelan et al. (2008) realizaram um estudo em um vale no Monte Carmel localizado em Israel, que possui um lado sul, o qual recebe uma radiação solar 200%-800% vezes maior do que o lado norte, mais sombreado e de clima temperado. Neste estudo foi constatado que os fungos do lado sul apresentavam maior concentração de melanina do que os fungos do lado norte, além de possuírem maior resistência à irradiação UVA, indicando uma adaptação específica de fungos do solo, em que a concentração de melanina em diferentes estirpes corresponde a uma diferente pressão de seleção de radiação UV.

Fungos melanizados podem sobreviver inclusive em ambientes com alto nível de radiação como, por exemplo, em reatores nucleares como os de Chernobyl, nos quais 80% da mycobiota são de fungos que contêm melanina (Zhdanova et al., 2000). Recentes investigações confirmaram que alguns fungos melanizados não são somente radorresistentes, mas o seu crescimento e proliferação são estimulados sob níveis de radiação ionizante (Dadachova e Casadevall, 2008; Robertson et al., 2012).

Em um estudo sobre os efeitos de níveis de Raios x em células melanizadas de *Cryptococcus neoformans* foi demonstrado que os efeitos da melanina na proliferação fúngica são dependentes da energia do pico de Raios x, pois um nível maior de Raios x (320 kVp) promoveu uma maior estimulação no crescimento de células melanizadas de *C. neoformans* do que um nível menor (150 kVp) (Shuryak et al., 2014). Os mecanismos para essa dependência de energia ainda não são bem conhecidos. Relatos anteriores têm demonstrado que a radiação ionizante altera o comportamento de oxidação-redução da melanina (Turick et al., 2011) e que a melanina afeta os níveis de ATP da célula irradiada (Bryan et al., 2011).

A melanina é um poderoso quelante de cátions e pode agir como um dreno de radicais (Jacobson, 2000). Este pigmento possui atividade sequestradora de radicais, como foi visto em um ensaio in vitro da melanina extraída do fungo *Aspergillus fumigatus* incubada com os seguintes agentes oxidantes: DPPH, ABTS, NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, radicais superóxido e radicais hidroxila (Nitya e Suganthi, 2013).

A atividade antioxidante da melanina já foi relatada para diversos fungos como *Sporotrix schenckii* (Romero-Martinez et al., 2000), *Fonsecaea pedrosoi* (Cunha et al., 2010), *Aspergillus nidulans* (Gonçalves e Pombeiro-Sponchiado, 2005), *Wangiella dermatitidis* e *Alternaria alternata* (Jacobson et al., 1995), sendo considerada um material promissor na indústria cosmética para a formulação de cremes que protegem a pele contra um possível dano oxidativo.

Os pigmentos melânicos também protegem os fungos patogênicos contra morte oxidativa provocada por macrófagos, como no caso do fungo patogênico *Cryptococcus neoformans*, em que mutantes selecionados para o albinismo são sensíveis aos oxidantes em relação ao tipo selvagem melanizado que tem sua susceptibilidade reduzida (Wang e Casadevall, 1994).

Ambientes hipersalinos são considerados ambientes de condições extremas, nos quais a melanina desempenha um importante papel na sobrevivência dos fungos que os habitam. No ascomyceto *Hortaea werneckii* tratado com inibidores de melanina e concentrações de NaCl foi observado que a ausência deste pigmento perturba a integridade da parede celular, limitando a divisão celular e expondo-o, assim, aos efeitos prejudiciais das altas concentrações de NaCl (Kejzar et al., 2013). Em baixas concentrações de NaCl, a perda de glicerol devido à baixa porosidade da parede celular em células não melanizadas também pode contribuir para os efeitos da salinidade (Kogej et al., 2007).

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 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, porém alguns estudos têm sugerido mecanismos nos quais a melanina induz as interligações entre polissacarídeos da parede celular e/ou promove impedimentos estéricos acumulando-se nos espaços existentes na rede de polissacarídeos da parede celular (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 dos metais, resultando em um conjunto de múltiplos sítios de ligação (Saiz-Jimenez e Shafizadeh, 1984; Sakaguchi e Nakajima, 1987).

### 2.1.2.1. Virulência

Grande parte das funções da melanina citadas anteriormente foi relatada em fungos patogênicos. No entanto, outra função da melanina tem se destacado nestes organismos, que se trata do poder de virulência deste pigmento. Fungos fitopatogênicos infectam seu hospedeiro com o auxílio de uma estrutura chamada apressório que consiste em uma estrutura de diferenciação celular, desenvolvida a partir de estímulos químicos liberados pela planta e que facilita a adesão e penetração no hospedeiro (Mendgen e Deising, 1993). Em diversos táxons o apressório é fortemente pigmentado, ou seja, é coberto por uma parede celular melanizada (Howard e Ferrari, 1989).

Apressórios melanizados dos fungos fitopatogênicos *Pyricularia oryzae*, *Magnaporthe grisea*, *Colletotrichum lagenarium* e *Gaeumannomyces graminis* possuem maior capacidade de penetrar na célula hospedeira quando comparados com mutantes albinos destas espécies (Woloshuk et al., 1983; Kubo et al., 1991; Howard e Valent, 1996; Money et al., 1998).

A melanina existente no apressório limita a permeabilidade da parede, facilitando o acúmulo de osmólitos e a geração de turgor dentro da célula (Hamilton e Gomez, 2002). Sem esta pressão de turgor, o grampo de infecção que brota da superfície adesiva do apressório não consegue mecanicamente penetrar o tecido do hospedeiro (Henson et al., 1999). A melanização pode desempenhar um papel na rigidez da parede celular, tornando o apressório resistente a colapsos durante períodos de dessecação (Horbach et al., 2013). Enzimas hidrolíticas fúngicas podem ser retidas na melanina que está próxima à parede celular, estabilizando e concentrando sua atividade próxima à célula



fúngica, tornando seus produtos enzimáticos facilmente disponíveis para o fungo (Hignett et al., 1979).

Se tratando de fungos patogênicos causadores de doenças em humanos, diversos mediadores inflamatórios são liberados pelos macrófagos a fim de inibir a infecção fúngica, entre os quais está a produção de citocinas como o interferon-gama (INF- $\gamma$ ), a interleucina (IL-12) e fator- $\alpha$  de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), além de espécies reativas de oxigênio, principalmente peróxido de hidrogênio e o óxido nítrico (Shoham e Levitz, 2005).

Uma cepa de *Cryptococcus neoformans*, que produz grandes quantidades de melanina, inibe a produção do Fator- $\alpha$  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- $\alpha$  enquanto uma cepa melanótica causou extenso dano e inibiu a resposta de citocinas (Barluzzi et al., 2000). Conídios albinos do fungo *Aspergillus fumigatus* estimularam significativamente uma alta produção das citocinas IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  em comparação ao tipo selvagem. Tal fato pode ter ocorrido, pois a camada de melanina pode estar fisicamente mascarando o efeito estimulatório de padrões moleculares associados a patógenos, como  $\beta$ -glucano e derivados de manano localizados na superfície conidial (Chai et al., 2010).

A presença de melanina no fungo *Fonsecaea pedrosoi* tem um efeito inibitório na fagocitose mediada por receptores e o protege contra a destruição pelas células do hospedeiro in vitro (Farbiarz et al., 1992). Este pigmento já foi encontrado em vacúolos fagocíticos que contêm fungos ingeridos e pode agir, provavelmente, como um mecanismo de evasão da resposta imune do hospedeiro (Silva et al., 2006). Outros fungos produtores de melanina também aumentam a resistência à fagocitose pelos macrófagos como *Penicillium marneffe* (Liu et al., 2014), *Cryptococcus neoformans* (Wang et al., 1995) e *Paracoccidioides brasiliensis* (Silva et al., 2006). No fungo *Aspergillus fumigatus*, a melanina inibe a apoptose em macrófagos que já tenham fagocitado conídios melanizados (Volling et al., 2011). A resposta imune do hospedeiro também pode ser inibida pela melanina através da redução da capacidade de stress oxidativo dos macrófagos pela inibição de óxido nítrico (Gonçalves et al., 2013).

As melaninas também promovem resistência a drogas antifúngicas como a anfotericina B, itraconazol e cetoconazol. Tais drogas se ligam à melanina, tornando-a, assim, um alvo para o desenvolvimento de novos medicamentos com maior eficácia no tratamento contra doenças causadas por fungos patogênicos (Wang e Casadevall, 1994; Van De Sande et al., 2007).

Os pigmentos melânicos são substâncias complexas, com diversos genes, fatores de transcrição e enzimas envolvidos no seu processo de síntese, os quais podem levar à produção de diversos metabólitos intermediários e influenciar na sua capacidade de virulência. Desta forma, o papel destes pigmentos na consolidação das estruturas de penetração dos agentes patogênicos pode não depender simplesmente de uma única melanina, mas sim de uma mistura de vários compostos melânicos (Liu et al., 2011).

### **2.1.3. As melaninas e os ácidos húmicos**

As substâncias húmicas são os maiores componentes da matéria orgânica do solo. São substâncias orgânicas heterogêneas, de cor escura, alto peso molecular e refratárias, sendo originárias da decomposição, e atividade microbiana relacionada, de materiais biológicos mortos, especialmente tecidos de plantas (Orsi, 2014). As substâncias húmicas são usualmente separadas em três frações baseadas na sua solubilidade aquosa: ácidos fúlvicos (solúveis em meio aquoso ácido ou básico), ácidos húmicos (solúveis em meio alcalino e coagulam quando o meio alcalino é acidificado) e huminas (fração insolúvel ou residual). Estes compostos desempenham diversas funções ecológicas, sendo responsáveis pela fertilidade do solo, influenciando sua estrutura e porosidade, através do seu efeito na agregação de partículas. Além disso, fornecem nutrientes através da mineralização, quelam metais potencialmente tóxicos e influenciam diretamente a biota do solo (Hayes e Malcom, 2001; Kulikova et al., 2005).

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 (Paim et al., 1990). 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). Inclusive, ainda não foi possível determinar a estrutura conformacional das melaninas e dos ácidos húmicos, porém, um consenso geral descreve os ácidos húmicos como uma mistura supramolecular heterogênea de moléculas relativamente pequenas, com peso molecular de alguns milhares de gramas por mol, que se associam dinamicamente através de interações fracas, especialmente ligações de hidrogênio e forças hidrofóbicas (Piccolo, 2002; Šmejkalová e Piccolo, 2007; Nebbioso e Piccolo, 2012).

As melaninas produzidas por fungos de solo podem possivelmente formar 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 (Façanha et al., 2002; Dobbss 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 expansinas, as quais pareciam ter ação proteolítica sobre a parede celular (Mcqueen-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<sup>+</sup>-ATPases de membrana plasmática (Rayle e Cleland, 1992) e promove também a síntese de novas P-H<sup>+</sup>-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 autoinibitória destas enzimas (Takahashi et al., 2012).

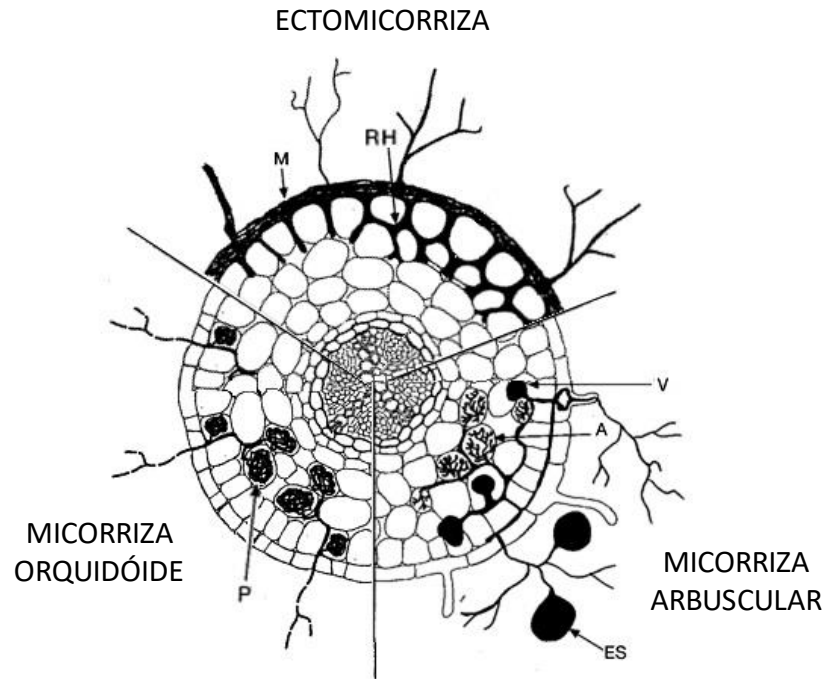
As ATPases, então, passam a bombear mais prótons para o meio extracelular, levando a uma acidificação do apoplasto. Tal acidificação promove a ativação das expansinas, cuja ação foi explicada anteriormente, e a absorção de nutrientes como o K<sup>+</sup> através de transportadores antiportes e canais de cátions (Tode e Lüthen, 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).

## **2.2. Micorrizas**

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 (Figura 2): 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 que ocorra 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 (Imhof, 2009; Smith e Read, 2008).



**Figura 2.** Visão geral esquemática das diferentes formas de micorriza. M=Manto, RH=Rede de Hartig, V=Vesícula, A=Arbuscúlo, ES=Esporo, P=Peloton (Adaptado de Gianinazzi e Gianinazzi-Pearson, 1988).

A formação das ectomicorrizas inclui quatro estágios. No estágio de pré-colonização ocorre o reconhecimento da hifa pelo hospedeiro e vice-versa. 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, enquanto a alongação de pelos radiculares e da própria raiz são, momentaneamente, inibidos pelo fungo. 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, 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 simbiontes, estabelecendo um equilíbrio em termos de colonização (Horan et al., 1988; Le Quéré et al., 2005).

No estágio de pré-colonização 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 tinctorius* (Lagrange et al., 2001), assim como a citoquinina zeatina foi capaz de induzir a ramificação em hifas de ectomicorrizas (Martin et al., 2001). Em exudatos 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, 2008; 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  $\mu\text{M}$  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*. Inclusive 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 tinctorius* e altamente produzida na formação da ectomicorriza é o alcaloide indólico hifaforina (Béguiristain 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 e Lapeyrie, 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 superexpresso durante a formação da ectomicorriza. Tem sido sugerida a participação da hifaforina na regulação do 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* existem duas estirpes diferentes, uma específica de *Pinus spp.* e outra específica de *Eucalyptus spp.* (Krügner 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 (Alves et al., 2001; Augé, 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 (Landeweert 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 tinctorius* 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 (Sylvia e Sinclair, 1983; Chakravarty e Unestam, 1987).

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; Dueié et al., 2008). Os mecanismos envolvidos em aumentar essa tolerância são diversos 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.



### **2.2.1. O transporte de nutrientes na simbiose micorrízica**

Em uma baixa disponibilidade de nutrientes, o fungo micorrízico absorve e transporta fósforo e outros nutrientes do solo para as raízes da planta hospedeira, e em troca, esta fornece o carbono fixado pela fotossíntese (Marschner e Dell, 1994). Plantas micorrizadas podem absorver nutrientes do solo por duas vias principais: a via da planta, que envolve a absorção dos nutrientes do solo diretamente pela epiderme radicular e pelos radiculares; a outra via é a do fungo micorrízico, que envolve a captação dos nutrientes a partir do micélio fungico extraradicular e o transporte do mesmo até a interface apoplástica das células da raiz, sendo então captadas de fato pelas plantas (Schachtman et al., 1998).

Estudos sugerem que em associações ectomicorrízicas a troca de nutrientes ocorre simultaneamente através da mesma interface. Esta interface é formada pelas membranas plasmáticas e paredes celulares dos simbiossiontes, e o apoplasto interfacial existente entre a planta e o fungo (Bücking e Heyser, 2001). Em associações micorrízicas arbusculares, além de existir as interfaces intercelulares, que são formadas por hifas crescendo entre as células do córtex radicular, existem também interfaces intracelulares, pois a hifa intercelular penetra na parede celular da célula hospedeira e se desenvolve dentro da mesma, formando estruturas tais como vesículas e arbuscúlos (Smith e Smith, 2012).

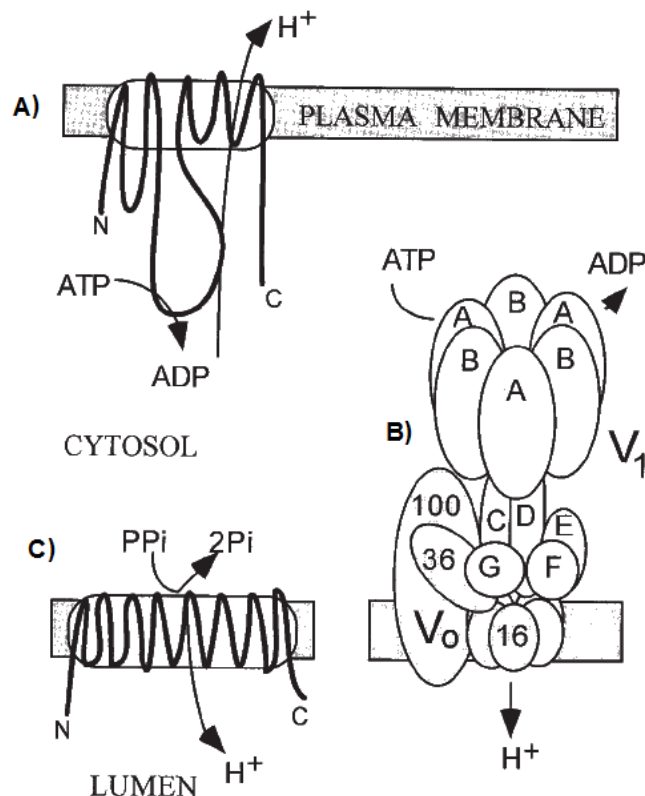
O fluxo de íons através das membranas biológicas é desempenhado por proteínas de membrana que constituem canais, carreadores e bombas iônicas. Esses sistemas possibilitam não somente o trânsito de metabólitos nas membranas, como também estabelecem e mantêm gradientes iônicos que são essenciais para vários processos metabólicos (Taiz e Zeiger, 2013). As proteínas canais contêm poros hidrofílicos e estão inseridas na bicamada lipídica. Os solutos solúveis em água movem-se através da membrana, por difusão, passando por estes poros. O lúmen do canal é acessível por cada lado da membrana simultaneamente, por isso os canais são sempre uniporteres. Já nos carreadores, os seus sítios de ligação de substrato nunca estão acessíveis dos dois lados da membrana simultaneamente. Devido a esta diferença, em relação aos canais, os carreadores são capazes de realizar o co-transporte, o qual pode ser realizado

para a mesma direção (simporte) ou em direções contrárias (antiporte) (Wolfersberger, 1994).

Nos sistemas celulares das plantas, o transporte de solutos e metabólitos para dentro e para fora da célula ocorre, principalmente, devido ao gradiente eletroquímico de  $H^+$  (transporte ativo primário). Este gradiente é produzido por bombas conhecidas como  $H^+$ -ATPases, as quais são encontradas tanto em plantas quanto em fungos, e utilizam a energia liberada pela hidrólise do ATP para transportar prótons através da membrana (Sondergaard et al., 2004). O transporte de inúmeras substâncias químicas através das membranas vegetais, mediado por carreadores, encontra-se acoplado a existência deste gradiente de prótons (transporte ativo secundário) (Portillo, 2000).

#### **2.2.1.1. P- $H^+$ -ATPases**

Uma das principais proteínas responsáveis pelo transporte de nutrientes entre fungos e plantas é a  $H^+$ -ATPase de membrana plasmática (P- $H^+$ -ATPase) (Figura 3A). Esta enzima localiza-se na membrana plasmática e pertence ao tipo P da família ATPase, que são caracterizadas pela formação de um intermediário fosforilado durante o ciclo catalítico, inibição pelo vanadato e similaridade estrutural em vários domínios conservados. Sua função básica é criar um gradiente eletroquímico, o qual leva a um transporte ativo secundário de nutrientes e regula o pH intracelular (Bublitz et al., 2012). Além disso, estas bombas desempenham diversos papéis na transdução de sinais durante a expansão celular, regulação do pH citoplasmático, tolerância a salinidade e regulação da abertura estomatal (Sondergaard et al., 2004; Merlot et al., 2007; Krajinski et al. 2014).



**Figura 3.** Estruturas das bombas de prótons. (A) P-H<sup>+</sup>-ATPase (B) V- H<sup>+</sup>-ATPase. (C) H<sup>+</sup>-PPase. (Sze et al., 1999).

A região C terminal autoinibitória da P-H<sup>+</sup>-ATPase de membrana plasmática pode ser fosforilada servindo como sítio de ligação para as proteínas reguladoras 14-3-3 que ativam as P-H<sup>+</sup>-ATPases (Fuglsang et al., 1999). Este complexo ativado consiste de um arranjo formado por seis monômeros de H<sup>+</sup>-ATPases arranjados em uma estrutura hexamérica juntamente com seis moléculas de 14-3-3 (Kanczewska et al., 2005). A P-H<sup>+</sup>-ATPase é regulada mais efetivamente ao nível pós-traducional, principalmente pelo aumento do acoplamento entre o transporte de H<sup>+</sup> e a hidrólise de ATP, sugerindo que esta enzima pode responder mais rápido aos desafios impostos pelo ambiente (Gaxiola et al., 2007).

Dois fatores principais são responsáveis pela regulação da P-H<sup>+</sup>-ATPase: glicose e pH ácido. A glicose é o fator externo que mais tem sido estudado. Ela tem um papel duplo tanto na expressão quanto na atividade catalítica desta enzima. Outros fatores que aumentam a atividade da enzima são os estresses

ambientais, como presença de etanol, ácidos orgânicos fracos, altas temperaturas, choque de calor e privação de fontes de nitrogênio; enquanto a redução de glicose e baixas temperaturas diminuem a atividade da enzima. Em leveduras a importância deste mecanismo foi descoberta pela observação da relação entre os níveis de ATPase e a taxa de crescimento da levedura (Portillo, 2000).

As P-H<sup>+</sup>-ATPases estão ativas na membrana de plantas micorrizadas (membrana periarbuscular), circundando arbúsculos e gerando um compartimento intracelular ácido. Porém em células não colonizadas e nas células do parênquima cortical de raízes não micorrizadas, não foi constatada atividade da P-H<sup>+</sup>-ATPase (Gianinazzi-Pearson et al., 2000). Em nível molecular, a up-regulação de genes das P-H<sup>+</sup>-ATPases por fungos micorrízicos arbusculares tem sido extensamente demonstrada (Ferrol et al. 2002; Krajinsky et al., 2002; Valot et al., 2006). Na associação ectomicorríza *Pinus sylvestris*-*Laccaria laccata* uma alta atividade da P-H<sup>+</sup>-ATPase foi associada a células corticais e fúngicas, localizadas na Rede de Hartig, local em que as células fisiologicamente ativas dos simbiontes estão em contato íntimo, para que ocorra a troca de carboidratos e nutrientes inorgânicos (Lei e Dexheimer, 1988). Além disso, também foi detectada uma atividade ATPásica nas hifas do manto e nas hifas externas, demonstrando a absorção de nutrientes do substrato pelas hifas externas, sendo translocados pelo manto.

#### **2.2.1.2. V-H<sup>+</sup>-ATPases e H<sup>+</sup>-PPases**

As V-H<sup>+</sup>-ATPases diferem tanto estrutural quanto funcionalmente das H<sup>+</sup>-ATPases de membrana plasmática (Figura 3B). A hidrólise do ATP feita pelas V-H<sup>+</sup>-ATPases não gera um intermediário fosforilado, logo, essas enzimas não são sensíveis ao vanadato, o qual inibe as P-H<sup>+</sup>-ATPases. Mas, as ATPases vacuolares são inibidas pelo antibiótico bafilomicina e por altas concentrações de nitrato, sendo que nenhum deles inibe as ATPases de membrana plasmática (Taiz e Zeiger, 2013).

As ATPases vacuolares são grandes complexos enzimáticos compostos por dois setores: V<sub>1</sub> e V<sub>0</sub>. O primeiro é composto de cinco a oito unidades e é

reponsável pela hidrólise do ATP. Já o segundo é composto de três a cinco subunidades e é responsável pela translocação de prótons (Sze et al., 1999). Dentro das células, as V-H<sup>+</sup>-ATPases mantêm um gradiente eletroquímico de prótons pelos compartimentos endomembranares, incluindo o vacúolo, e fornecem energia para o transporte ativo secundário de prótons. Para manter a neutralidade elétrica global, ânions como Cl<sup>-</sup> e malato<sup>2-</sup> são transportados do citoplasma para dentro do vacúolo via canais iônicos. Devido à ação da V-H<sup>+</sup>-ATPase na translocação, primária e secundária, de prótons o pH do vacúolo se mantém ácido, em torno de 5,5, e pH do citoplasma se mantém básico, entre 7,0 e 7,5 (Morano e Klionsky, 1994; Sze et al., 1999).

Devido ao fato do ATP ser a principal fonte de energia das células, a atividade da ATPase vacuolar é superior à atividade da H<sup>+</sup>-PPase (Sze et al., 1999). Esta enzima, composta de um polipeptídeo simples (Figura 3C), hidrolisa o pirofosfato (PPi) ao invés do ATP, atuando em sincronismo com a V-H<sup>+</sup>-ATPase de tonoplasto e com a P-H<sup>+</sup>-ATPase na energização dos sistemas de transporte secundário e no controle da homeostase citoplasmática (Gaxiola et al., 2007). Nas plantas, em diversas condições fisiológicas e de estresse, o PPi pode assumir o papel do ATP atuando como doador de energia metabólica da célula (Ramos et al., 2005).

É conhecido que a acumulação de elevadas concentrações de PPi no citosol inibe as reações de polimerização. Assim, a H<sup>+</sup>-PPase vacuolar recolhe o PPi no citosol e o usa como fonte de energia para o transporte de prótons em vacúolos em expansão (Maeshima, 2000). Sabe-se que o nível de H<sup>+</sup>-PPase em plantas é regulado sobre condições de estresse. Kasai et al. (1998), examinaram o efeito de nutrientes mineirais, como K<sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e Ca<sup>2+</sup> sobre a H<sup>+</sup>-PPase em raízes de centeio. Tanto a hidrólise de PPi como o gradiente de transporte de prótons, em plantas crescidas em deficiência mineral, foram três vezes maiores do que as plantas crescidas em condições normais.

O papel preciso da H<sup>+</sup>-PPase ainda é controverso. As células de plantas parecem ter um nível significativo de PPi no citosol, sendo suficiente para levar a H<sup>+</sup>-PPase à metade da sua taxa máxima (Taiz, 1992). A atividade de H<sup>+</sup>-PPase é superexpressada em resposta a estresses de energia, como frio e anoxia. O conteúdo celular de PPi permanece estável durante alterações no estado respiratório. Estas observações sugerem que a H<sup>+</sup>-PPase possui um papel

essencial na sobrevivência de plantas durante condições de baixa disponibilidade de ATP (Façanha e De Meis, 1998).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Cultura do fungo ectomicorrízico

O isolado fúngico ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (isolado 24) 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 Merlin Norkrans Modificado (MNM) (Marx, 1969).

As culturas foram crescidas na ausência de luz, à temperatura de  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$  em incubadora BOD, no meio de cultivo MNM (Marx, 1969), contendo:  $\text{CaCl}_2$  ( $0,05 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{NaCl}$  ( $0,025 \text{ g L}^{-1}$ ),  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  ( $0,15 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $0,15 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{FeCl}_3$  ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ), 4mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $0,125 \text{ g L}^{-1}$ ), 100  $\mu\text{L}$  tiamina ( $50 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ ),  $15 \text{ g L}^{-1}$  de agar-agar,  $10 \text{ g L}^{-1}$  de glicose,  $2 \text{ g L}^{-1}$  de peptona,  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de levedura e tampão MES  $0,5 \text{ M}$ . O pH do meio foi ajustado para 5,5-5,6 antes da autoclavagem a  $121^{\circ} \text{C}$  por 20 minutos. Diversos discos de ágar (11 mm de diâmetro) foram removidos das bordas de colônias fúngicas ativas, colocados em placas de Petri (10 x 100 mm) contendo 25 mL do meio MNM e incubados a  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 20 dias. Transferências quinzenais para meio fresco de igual composição foram realizadas.

### 3.2. Cultivo do fungo e produção de melanina em meio líquido

Cinco discos de ágar (11 mm de diâmetro) foram removidos das bordas de colônias fúngicas ativas crescidas em meio sólido MNM e foram inoculados em frascos Erlenmeyer contendo 150 mL de meio líquido MNM, com o triplo de tiamina (Marx, 1969). O pH do meio foi ajustado para 5,5-5,6 e os frascos Erlenmeyer foram transferidos para uma incubadora shaker para cultivo por 30 dias a 23°C e 60 rpm.

### 3.3. Extração da melanina

Para extração da melanina o fungo *P. tinctorius* foi cultivado em meio MNM líquido e após 30 dias o micélio foi separado e o meio foi filtrado. Após filtração, o meio foi acidificado a pH 3,0 com HCl 1 M e o precipitado contendo o pigmento foi separado do sobrenadante por centrifugação a 4000 g por 10 min. O precipitado foi então suspenso em NaOH 1 M. Em seguida a solução foi novamente acidificada com HCl 1 M a pH 3,0 e o precipitado foi separado por centrifugação a 4000 g por 10 min. Este processo foi repetido por mais três vezes a fim de obter um pigmento mais puro. Por fim, o pigmento foi submetido à diálise contra água destilada, liofilizado e armazenado em dessacador (Alviano et al., 1991).

### 3.4. Espectro de infravermelho e análise elementar

A análise de infravermelho com transformada de fourrier foi realizada com a melanina exudada pelo fungo *P. tinctorius*. Uma mistura de 1 mg das amostras com 100 mg de KBr foram prensadas, sob pressão reduzida, em pastilhadora com 8 toneladas por cm<sup>2</sup> de pressão, para obtenção das pastilhas de KBr. Este procedimento foi repetido três vezes para cada amostra, 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<sup>-1</sup>. O procedimento de subtração do espectro foi realizado para



inferir contaminações por H<sub>2</sub>O ou CO<sub>2</sub> (regiões de absorção de 3300-3400 cm<sup>-1</sup> e 2330-2350 cm<sup>-1</sup>, respectivamente).

A composição elementar da melanina exudada pelo fungo *P. tinctorius* e da melanina sintética L-DOPA (Sigma, M8631) foi avaliada através de um CNH Perkin-Elmer autoanalisador (Perkin-Elmer, Foster City, CA). O conteúdo de oxigênio foi obtido através da diferença e do conteúdo de cinzas da incineração de 50 mg das amostras a 700 °C por 8 h. 50 mg das melaninas brutas foram mineralizadas com uma solução concentrada de HNO<sub>3</sub>/HClO<sub>4</sub> até fumação, transferidas para frascos volumétricos de 20 mL e completadas até o volume final com água destilada. Esta solução foi analisada por espectrometria de absorção atômica (Perkin-Elmer AAS Analyst 700).

### 3.5. Quantificação da melanina

A curva padrão da melanina foi determinada através de medição da densidade óptica a 405 nm em um espectrofluorímetro (Chameleon V, Hidex, Turku, Finland), em uma série de concentrações (0; 0,016; 0,031; 0,063; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>) da melanina exudada pelo fungo e da melanina sintética L-DOPA, dissolvidas em NaOH 1 M (Oancea et al., 2009). Para quantificar a melanina exudada pelo fungo *P. tinctorius*, o fungo foi cultivado em meio líquido MNM e a cada 7 dias, 250 µL do meio foram removidos e sua densidade óptica foi medida a 405 nm em espectrofluorímetro (Chameleon V, Hidex, Turku, Finland). A concentração de melanina foi estimada a partir da curva padrão.

### 3.6. Crescimento das plantas em diferentes concentrações de melanina

Sementes de *Eucalyptus urograndis*, obtidas no Departamento de Sivilcultura da Universidade Federal de Viçosa, foram desinfestadas com álcool etílico 70% por 30 s, hipoclorito de sódio 1 % (v/v) por 5 min, lavadas 5 vezes em água deionizada e embebidas durante 20 min também em água deionizada. Em seguida, as sementes foram colocadas em placas de Petri (5 sementes por placa

e 5 placas por tratamento) contendo 10 mL de meio nutriente adaptado para baixo sal (Ramos et al. 2009), composto por: 0,037 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,1 mM MgSO<sub>4</sub>; 0,5 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 0,1 mM KCl; 0,1 mL L<sup>-1</sup> de solução de micronutrientes (Clark, 1975); 0,025 mL L<sup>-1</sup> Fe-EDTA; 1 % (w/v) ágar-ágar (Sigma-Aldrich, Gillingham, UK), ao qual foi adicionado melanina exudada pelo fungo *P. tinctorius* nas seguintes concentrações: 0, 10, 50, 250, 750 ou 1000 mg L<sup>-1</sup>. O pH do meio foi ajustado para 5,5-5,6 e as placas de Petri foram incubadas por 10 dias em câmara de crescimento (12/12 h claro/escuro, (350 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 22 °C).

### **3.7. Medições dos fluxos de H<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e correntes utilizando o sistema de eletrodos vibráteis íons-seletivos (SIET)**

Neste estudo foram analisadas duas condições: sem melanina no meio de medição do SIET (meio de banho (-) melanina) e com melanina no meio de medição do SIET (meio de banho (+) melanina). Nas duas condições todas as plântulas cresceram por 10 dias em meio sólido com diferentes concentrações de melanina. Após esse período as plântulas foram coletadas e colocadas em placas de Petri contendo o meio nutriente adaptado para baixo sal líquido, para as medições nos fluxos iônicos no SIET (meio de banho (-) melanina). Porém, para a condição de meio de banho (+) melanina, as plântulas foram retiradas do meio sólido e incubadas overnight no meio nutriente adaptado para baixo sal líquido, adicionado das concentrações de melanina (exudada pelo fungo *P. tinctorius*) selecionadas (0, 10, 50, 250, 750 e 1000 mg L<sup>-1</sup>) e este meio, contendo melanina, foi utilizado para as medições no SIET.

Uma descrição detalhada do procedimento experimental da técnica de eletrodos vibráteis íons-seletivos, utilizada neste estudo, já foi bem descrita em estudos anteriores (Feijó et al., 1999; Zonia et al., 2002; Ramos et al., 2009).

Plântulas de *E. urograndis* foram colocadas em placas de Petri de plástico (140 x 140 mm) contendo 30 mL do meio nutriente adaptado para baixo sal, exceto para as medições de Ca<sup>2+</sup>, em que 100 µM Ca<sup>2+</sup> foi utilizado. Os microeletrodos vibráteis ion-específicos foram produzidos como descrito por Feijó et al. (1999). Estes foram produzidos de microcapilares de borosilicato com diâmetro exterior de 1,5 mm e 1,12 mm de diâmetro interior (www.sutter.com),

utilizando o aparelho Puller Flaming Brown, Sutter P-98 (Sutter Instruments, Novato, CA). Posteriormente, os microeletrodos foram colocados sob um suporte de vidro coberto por um becker de vidro (1 L) e secos em estufa a 250 °C por 3 h. Após este período, foi realizada a silanização dos microcapilares, por exposição a vapor de N, N-dimetiltrimetilsilamina (C<sub>5</sub>H<sub>15</sub>NSi, Fluka 41716), ainda na estufa por 20 min e deixados para secar por mais 3 h, na mesma temperatura. Após a vaporização com silano (C<sub>5</sub>H<sub>15</sub>NSi), os microeletrodos foram preenchidos com uma solução de eletrólito (15 mM KCl e 40 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.0, para H<sup>+</sup> e 100 mM CaCl<sub>2</sub> para Ca<sup>2+</sup>) correspondente a uma coluna de 1,5 mm do eletrodo. Após esta etapa, os eletrodos foram preenchidos na ponta, com uma coluna de 20 a 25 µm do respectivo coquetel seletivo, contendo os ionóforos respectivos aos íons estudados (Fluka, Milwaukee, WI). Para estabelecer o contato elétrico com o meio, foi inserido na extremidade basal do microeletrodo, um suporte com um eletrodo de Ag/AgCl (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA).

O eletrodo de referência foi uma referência seca (DRIREF-2, World Precision Instruments), inserido no meio de banho da amostra. Os sinais foram medidos pelo amplificador ([www.applicableelectronics.com](http://www.applicableelectronics.com)), sendo a vibração e o posicionamento do eletrodo obtidos através de motores posicionais (stepper-motors), os quais permitem um movimento tridimensional. O controle dos motores, a aquisição de dados e o seu processamento preliminar foram ajustados no software ASET (Science Wares [East Falmouth, MA]-[www.sciencewares.com](http://www.sciencewares.com)). A calibração dos eletrodos foi realizada por medição do potencial (mV) registrado em três soluções contendo o íon em estudo, com concentração conhecida: 0,1 mM, 1 mM e 10 mM; dado que as concentrações abrangem as condições dos meios utilizados. Também foi realizada uma calibração dos eletrodos nas três soluções contendo o íon em estudo nas concentrações citadas acima, com a adição de melanina nas concentrações de 750 e 1000 mg L<sup>-1</sup>, a fim de registrar que a presença da melanina no meio da medição não estaria influenciando o eletrodo e as medições dos fluxos (Figuras S1 e S2).

A coleta dos dados da microsonda vibrátil seletiva, foi realizada pelo software ASET, que fornece a informação necessária para calcular o fluxo iônico em um determinado ponto [x, y, z] do espaço, por meio da lei de Fick ( $J = D (dc/dx)$ ). O coeficiente de difusão (D) é um valor tabelado para cada íon (de

acordo com Handbook of Chemistry and Physics, Chemical Rubber Co.). A diferença espacial ( $dx$ ) resulta do cálculo da distância entre os dois pontos em que foram realizadas as medições das concentrações para cálculo do fluxo (10  $\mu\text{m}$ ). A diferença de concentração ( $dc$ ) é um vetor que varia ao longo do ensaio. Em cada ponto, a concentração pode ser calculada a partir do valor de mV registrado no dado ponto e da equação previamente determinada para o ionóforo durante o processo de calibração.

### **3.8. Avaliação do número de primórdios formadores de raízes laterais**

Raízes de plântulas de *E. urograndis* dos tratamentos 0 e 750  $\text{mg L}^{-1}$  de melanina, foram coletadas e analisadas individualmente ( $n=10$ ). O sistema radicular foi coletado, lavado com água e clareado em solução de KOH 0,5 % durante 20 minutos em banho-maria a 75 °C. Após este clareamento, as amostras de raízes foram lavadas novamente e mantidas no escuro por pelo menos 1 h imersas em solução corante de hematoxilina férrica para marcação dos sítios de mitose. Posteriormente, as raízes foram enxaguadas com água e clareadas com ácido láctico 80 % durante 30 segundos em banho-maria a 75 °C. As raízes inteiras foram transferidas individualmente para lâminas com água destilada e observadas sob microscópio óptico Axioplan ZEISS (Carls Zeiss, Jena, Germany), adaptado com câmera digital AxioCam MRc5 para captura de imagens, e software AxioVisionLE versão 4.8 (Carls Zeiss, Jena, Germany) para análise das imagens. Os sítios mitóticos aparecem como pontos escuros contra um fundo da cor do tecido da raiz. O estoque de solução de hematoxilina contém 1 g de hematoxilina, 0,5 g de sulfato férrico de amônio e 50 mL de ácido acético a 45 %. A tintura estoque (40 vezes concentrada) foi mantida em ambiente protegido da luz em temperatura ambiente.

### **3.9. Microscopia óptica**

Raízes de plântulas de *E. urograndis* dos tratamentos 0, 10, 50, 250 750 e 1000  $\text{mg L}^{-1}$  de melanina, foram coletadas e fixadas em solução de glutaraldeído

2,5 %, paraformaldeído 4,0 % e tampão fosfato 0,05 M pH 7,2, por 2 h. Em seguida foram feitas três lavagens de 30 min em tampão fosfato 0,05 M. Posteriormente, as raízes foram desidratadas em uma série alcoólica crescente (30, 50, 70, 90 e 2 vezes 100 %), durante 1h e 30 min. Em seguida as amostras foram infiltradas com resina LR White e etanol 100% (1:1; v/v) por 12 h, seguido de resina 100% por 24 h e polimerização em estufa a 50 °C. Foram realizados cortes de 3 a 5 µm de espessura em micrótomo (Leica) a 10 µm das pontas das raízes, os quais foram corados com solução aquosa de azul de toluidina (1,0 %). As amostras foram observadas em microscópio óptico Axioplan ZEISS (Carls Zeiss, Jena, Germany), adaptado com câmera digital AxioCam MRc5 para captura de imagens, e software AxioVisionLE versão 4.8 (Carls Zeiss, Jena, Germany) para análise das imagens.

### **3.10. Obtenção da fração microssomal**

A fração microssomal das raízes de *E. urograndis* foi isolada por meio de centrifugação diferencial (Giannini e Briskin, 1987). 10 g de raízes foram homogeneizadas em meio tamponado, usando gral e pistilo. O tampão de extração foi composto de sacarose 250 mM, glicerol a 10 %, DTT 3,3 mM, EDTA 5 mM, PVP- 40 0,5 %, KCl 150 mM, BSA 0,3 %, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM, Tris-HCl pH 7,6 100 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 1.500 g, durante 15 min. Para o isolamento das mitocôndrias, o sobrenadante foi novamente centrifugado a 10.000 g, por 20 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 10 %, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, banzamidina 1 mM, Hepes-KOH 10 mM pH 7,6 e EDTA 1 mM. As amostras foram congeladas em N<sub>2</sub> líquido e armazenadas em tubos criogênicos em freezer a -70°C. A concentração de proteínas foi determinada através do método de Bradford (1976).

### 3.10.1. Atividade da hidrólise de ATP das ATPases do tipo P

A atividade hidrolítica da P-H<sup>+</sup>-ATPase foi determinada colorimetricamente através da mensuração da liberação de Pi (Fiske e Subarrow, 1925). Para tal o meio de reação continha Tris-HCl 50 mM pH 6,5, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, KCl 100 mM, NaMoO<sub>4</sub> 0,2 mM, ATP 1 mM. A reação foi iniciada com a adição da proteína (30 µg mL<sup>-1</sup>) e parada após 30 min de incubação, pela retirada de alíquotas que foram imediatamente transferidas para tubos de ensaio contendo TCA em 5%, mantidos em gelo. A atividade hidrolítica foi mensurada com e sem Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0,2 mM e a atividade vanadato sensível foi atribuída a P-H<sup>+</sup>-ATPase. Para analisar os efeitos da melanina exudada pelo fungo *P. tinctorius* na hidrólise do ATP da P-H<sup>+</sup>-ATPase, 750 mg L<sup>-1</sup> de melanina foram incubados por 5 min com as vesículas contendo as P-H<sup>+</sup>-ATPases, antes do início da reação.

### 3.10.2. Atividade de bombeamento de H<sup>+</sup> das ATPases do tipo P

O gradiente de prótons foi mensurado através da taxa de decréscimo da fluorescência ( $\Delta F/\text{min}$ ) da sonda fluorescente metacromática, 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina (ACMA), excitada com um feixe de comprimento de onda de 415 nm e a emissão captada a 485 nm a 25 °C, em um espectrofluorímetro (model F-3010, Hitachi, Tokyo), utilizando um protocolo adaptado por Façanha e De Meis (1988). O meio reacional foi composto de Tris-HCl 10 mM pH 6,5, KCl 100 mM, ACMA 2 µM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, ATP 1 mM. A reação foi iniciada com a adição de 30 µg mL<sup>-1</sup> de proteína. A adição de 20 mM NH<sub>4</sub>Cl foi utilizada para revelar a recuperação da fluorescência que indica o colapso do gradiente de H<sup>+</sup> formado preliminarmente. A atividade de bombeamento de H<sup>+</sup> foi mensurada com e sem Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0,2 mM e a atividade vanadato sensível foi atribuída a P-H<sup>+</sup>-ATPase. Para analisar os efeitos da melanina exudada pelo fungo *P. tinctorius* na atividade de bombeamento de H<sup>+</sup> da P-H<sup>+</sup>-ATPase, 750 mg L<sup>-1</sup> de melanina foram incubados por 5 min com as vesículas contendo as P-H<sup>+</sup>-ATPases, antes do início da reação.

### 3.11. Immunoblotting

Para a marcação das P-H<sup>+</sup>-ATPases foram realizadas análises de western blotting. As vesículas contendo as membranas totais (10-20 µg) isoladas de raízes de *E. urograndis* crescidas em meio sólido contendo 0 ou 750 mg L<sup>-1</sup> de melanina, foram separadas em gel de SDS-PAGE 10% (p/v). Após a eletroforese, foi feita a transferência para uma membrana de nitrocelulose por 2 h a 100 V em tampão contendo Tris 25 mM, glicina 0,2 M e metanol em 20 %. Após a transferência, a membrana foi lavada, bloqueada sob agitação em solução contendo leite em pó comercial (molico) em 5 % por 1 h e incubada com o anticorpo policlonal (1:1000) contra a PMA1/2 H<sup>+</sup>-ATPase de *S. cerevisiae* (Y-193 300; Santa Cruz, Biotechnology, USA). O anticorpo primário foi diluído 1:1000 em solução leite em pó em 3% e incubado sob agitação por 30 min; após esse período a placa com a membrana foi mantida a 4 °C por 12 h.

Na etapa seguinte de revelação, a membrana foi lavada com leite em pó em 5 % por mais 1 h em agitação trocando a solução a cada 15 minutos. O anticorpo secundário conjugado a peroxidase anti-rabbit igG (GE Healthcare Bio-Sciences, NJ, USA) foi diluído 1:1000 em solução de leite em pó em 5% e incubado por 1 h em agitação. Após a incubação a membrana foi novamente lavada com solução de leite em pó em 5% em PBS 3x por 10 min sob agitação. Posteriormente, a membrana foi lavada com PBS 3x por 5 min sob agitação e visualizada utilizando-se um kit de detecção de reagentes por quimioluminescência (ECL Western blotting detection system; GE Healthcare).

### 3.12. Análise proteômica

Sementes de *Eucalyptus urograndis*, foram desinfestadas (como descrito no item 3.6) e colocadas pra germinação em placas de Petri (10 sementes por placa e 60 placas por tratamento) contendo 10 mL de meio nutriente adaptado para baixo sal (ver item 3.6), ao qual foi adicionada melanina exudada pelo fungo *P. tinctorius* nas seguintes concentrações: 0 ou 750 mg L<sup>-1</sup>. O pH do meio foi ajustado para 5,5-5,6 e as placas de Petri foram incubadas por 10 dias em câmara de crescimento (12/12 h claro/escuro, (350 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 22 °C).

### **3.12.1. Extração e quantificação das proteínas totais**

As proteínas foram extraídas seguindo a metodologia descrita por Damerval et al. (1986). Foram utilizadas 3 repetições biológicas por tratamento, sendo que cada repetição biológica consistiu de 200 raízes. As amostras foram maceradas, em nitrogênio líquido. A maceração resultou em um fino pó que foi colocado em um microtubo de 1,5 mL e em seguida foi adicionado 1 mL do tampão de extração TCA/acetona (10 % ácido tricloroacético em acetona) e agitado em vortex por 5 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram mantidas por 60 min a 4 °C e, posteriormente foram centrifugadas a 13.000 g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante proveniente da centrifugação foi descartado e o pellet foi lavado 3 vezes com acetona (100 %) gelada acrescida de 20 mM de DTT. Posteriormente, os pellets foram ressuspensos em 1 mL do tampão ureia/tiourea (7 M ureia, 2 M tiourea, 1 % dithiothreitol – DTT, 2 % triton-100, 1mM fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF)). As amostras foram transferidas para o gelo e mantidas por 30 min e, posteriormente foram centrifugadas a 13.000 g por 10 min. O sobrenadante proveniente da centrifugação foi então coletado e armazenado a -80 °C. Para a quantificação das proteínas totais das amostras, foi utilizado o método 2D-Quant Kit (GE Healthcare) de acordo com as informações fornecidas pelo fabricante. A leitura da absorbância de cada amostra e da curva padrão foi realizada em 480 nm em leitor de microplacas.

### **3.12.2. Análise LC-MS/MS**

Para as análises no espectrômetro de massa, as amostras foram preparadas de acordo com Reis et al. (2016). Inicialmente as amostras foram dessalinizadas em membranas 5000 MWCO Vivaspin 500, na qual foram adicionados 200 µL de bicarbonato de amônio 50 mM a pH 8,5 e centrifugado a 15.000 g durante 20 minutos a 8 °C. Este procedimento foi repetido pelo menos 3 vezes, restando cerca de 50 µL de amostra.

Para a digestão de proteínas, 25 µL RapiGest® 0,2% (v/v) foram adicionados e as amostras foram brevemente agitadas em vortex e incubadas em Eppendorf Thermomixer® a 80 °C durante 15 min. Em seguida, 2,5 µL de DTT 100 mM



foram adicionados e os tubos foram agitados e incubados a 60 °C durante 30 min sob agitação. Em seguida, foram adicionados 2,5 µL de 300 mM de iodoacetamida e as amostras foram incubadas no escuro durante 30 min à temperatura ambiente. A digestão foi realizada por adição de 20 µL de solução de tripsina (50 ng mL<sup>-1</sup>) (V5111, Promega, Madison, WI, EUA), mantidos por 15h a 37 °C, sob agitação. Posteriormente, para precipitação do RapiGest®, 10 µL de ácido trifluoroacético 5% (v/v) foi adicionado e incubado a 37 °C durante 90 min, seguido por centrifugação durante 30 min a 15.000 g. As amostras foram então transferidas para tubos de ensaio de recuperação total (Waters, EUA).

Um UPLC nanoACQUITY ligado a um espectrômetro de massa SYNAPT G2-Si HDMS (Waters) foi utilizado para análise de LC-ESI-MS/MS. Foi realizada uma injeção de 1 µL de cada amostra digerida para normalizar antes da quantificação relativa de proteínas. Para assegurar valores molares padronizados para todas as condições, a normalização entre amostras foi baseada em medições estequiométricas das contagens totais de íons. Durante a separação, as amostras foram carregadas para o nanoACQUITY UPLC 5 µm em uma pré-coluna C18 (180 µm x 20 mm) e, em seguida, para o nanoACQUITY HSS T3 1,8 em uma coluna analítica de fase reversa (100 µm x 100 mm) a 600 nL min<sup>-1</sup>, com uma temperatura de coluna de 60 °C. Para a eluição dos peptídeos, um gradiente binário foi utilizado com a fase móvel A que consiste em água e 0,1 % de ácido fórmico e a fase B móvel composta por acetonitrila e 0,1 % ácido fórmico. O gradiente de eluição foi realizado como os seguintes parâmetros: 7 % de B durante 3 min, com aumento gradual de 7 a 40 % de B até 90,09 min, e entre 40 e 85 % de B até 94,09 min, mantendo constante a 85 % até 98,09 min, diminuindo para 7 % de B até 100,09 min e mantendo constante a 7 % de B até o final da corrida em 108,09 min. A espectrometria de massas foi realizada em modo positivo e de resolução (modo V), com a resolução de 35,000 FWHM, com mobilidade iônica e modo de aquisição independente de dados (DIA); a velocidade de onda IMS foi ajustada para 600 m s<sup>-1</sup>; a energia de transferência de colisão variou entre 19 V a 45 V em modo de alta energia; voltagens de cone e capilaridade foi de 30 V e 2,800 V, respectivamente; e a temperatura da fonte foi de 70 °C. Em parâmetros TOF, o tempo de leitura foi ajustado para 0,5 s em modo contínuo com uma faixa de massa de 50 a 2,000 Da. A proteína [Glu1]-

fibrinopeptídeo B (Sigma-Aldrich) a  $100 \text{ fmol } \mu\text{L}^{-1}$  foi usada como calibrante externo.

### 3.12.3. Bioinformática

O processamento de espectros e as condições de base de dados foram estabelecidos utilizando Progenesis Q1 para Proteomics Software V.2.0 (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK). A análise foi realizada utilizando os seguintes parâmetros: uma clivagem dispensada, fragmento mínimo por peptídeo igual a um, fragmento mínimo por proteína igual a três, mínimo de peptídeos por proteína igual a 1, modificações fixadas de carbamidomethyl (C) e modificações variáveis de oxidação (M) e de fosforilo (STY), um máximo da taxa de detecção falsa padrão de 4%, score superior a cinco, e um erro de massa máxima de 10 ppm. As massas dos peptídeos gerados foram contrastadas com o banco de dados de *Eucalyptus grandis* (<http://www.plantgdb.org/EgGDB/>). Após a análise com o Progenesis e para garantir a qualidade dos resultados, foram utilizados os seguintes parâmetros de refinamento de proteínas: somente proteínas presentes em 3 de 3 corridas e com coeficiente de variação menor do que 0,5. Proteínas que foram diferencialmente expressas foram consideradas up-reguladas quando  $\log_2$  do fold change (FC)  $> 1$  e down-reguladas quando o  $\log_2$  do FC  $< -1$ . As proteínas selecionadas foram submetidas à anotação funcional utilizando o programa Blast2GO v.3.1 ([www.blast2go.com](http://www.blast2go.com)) e o programa Mapman v.3.6.0RC1.

### 3.13. Análises estatísticas

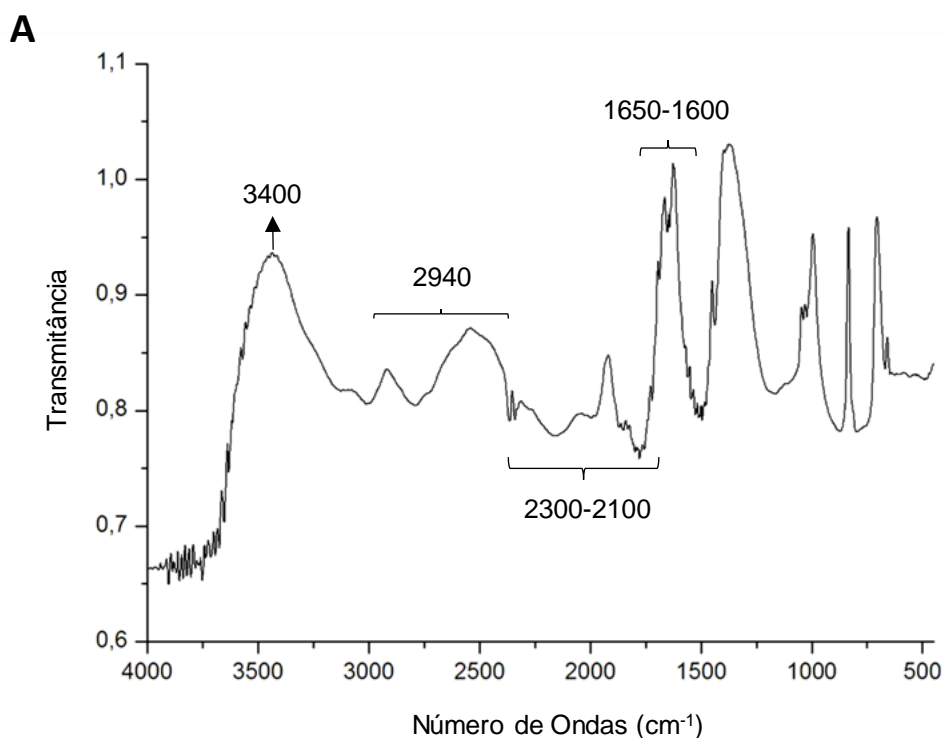
Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com: 6 concentrações de melanina (0, 10, 50, 250, 750 ou  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) e 25 repetições (5 sementes por placa de Petri e 5 placas de Petri por tratamento) para o primeiro experimento (fluxos iônicos) e 2 concentrações de melanina (0 ou  $750 \text{ mg L}^{-1}$ ) e 600 repetições (10 sementes por placa de Petri e 60 placas de Petri por tratamento) para o segundo experimento (proteômica). O comprimento da raiz principal das plantas de *Eucalyptus urograndis* e a

porcentagem de inibição foram analisados estatisticamente através de regressão linear. Os fluxos de  $H^+$  e  $Ca^{2+}$ , o pH da superfície radicular e a concentração extracelular de  $Ca^{2+}$ , medidos nas condições meio de medição (-) melanina e meio de medição (+) melanina, foram analisados estatisticamente através de two-way ANOVA. Quando um fator ou qualquer interação entre os fatores foram considerados estatisticamente significantes, foram realizadas comparações agrupadas através de um teste t de média, corrigindo os resultados correspondentes por comparações múltiplas utilizando o teste de Tukey a  $p \leq 0.05$ . Todas as análises foram conduzidas utilizando-se o programa GraphPad Prism 7.0, utilizando um nível de 5% de significância para os testes das hipóteses. Uma análise de componente principal (PCA) foi utilizada para correlacionar o crescimento de raiz, os fluxos iônicos, o pH da superfície radicular e a concentração extracelular  $Ca^{2+}$ , nas diferentes condições de medição: meio de medição (-) melanina e meio de medição (+) melanina, através do programa FITOPAC 2.1.2.85.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caracterização da melanina

A técnica de espectrometria de infravermelho forneceu informação sobre os principais grupos funcionais na estrutura da melanina exudada pelo fungo *P. tinctorius* (Figura 4A). O espectro de infravermelho mostrou: bandas fortes na região de  $3400\text{ cm}^{-1}$  referentes aos grupos -OH e -NH, na região próxima a  $2940\text{ cm}^{-1}$  observam-se vibrações dos grupamentos C-H de compostos alifáticos, a faixa entre  $2300\text{-}2100\text{ cm}^{-1}$  é característica dos grupos C≡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 elementar da melanina sintética L-DOPA e da melanina exudada pelo fungo *P. tinctorius* (Figura 4B) revelou um conteúdo similar de carbono (48,03 e 47,27%), nitrogênio (6,14 e 6,76%) e hidrogênio (5,20 e 5,10%), respectivamente, para os dois tipos de melanina.

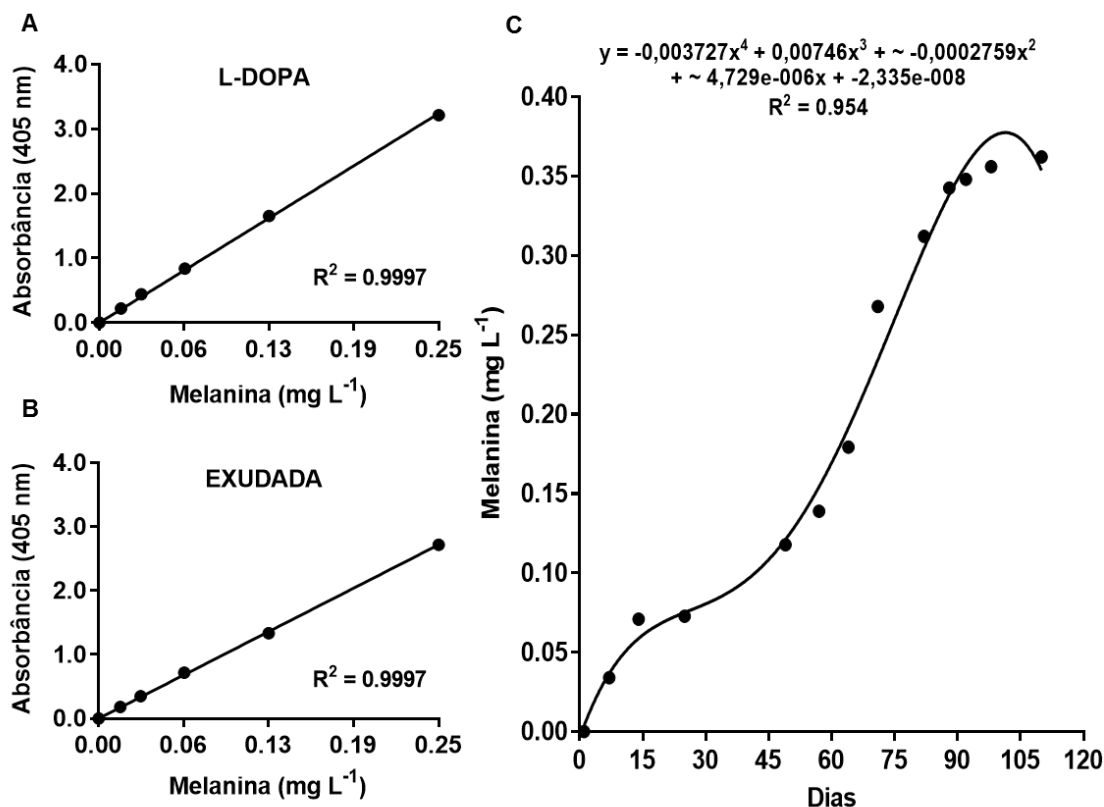


**B**

Fonte de Melanina	Carbono (%)	Nitrogênio (%)	Hidrogênio (%)
L-DOPA	48,03	6,14	5,20
Exudada	47,27	6,76	5,10

**Figura 4.** (A) Espectro de infravermelho da melanina exudada pelo fungo *Pisolithus tinctorius* no meio de cultura. (B) Composição elementar da melanina sintética (L-DOPA) e da melanina exudada.

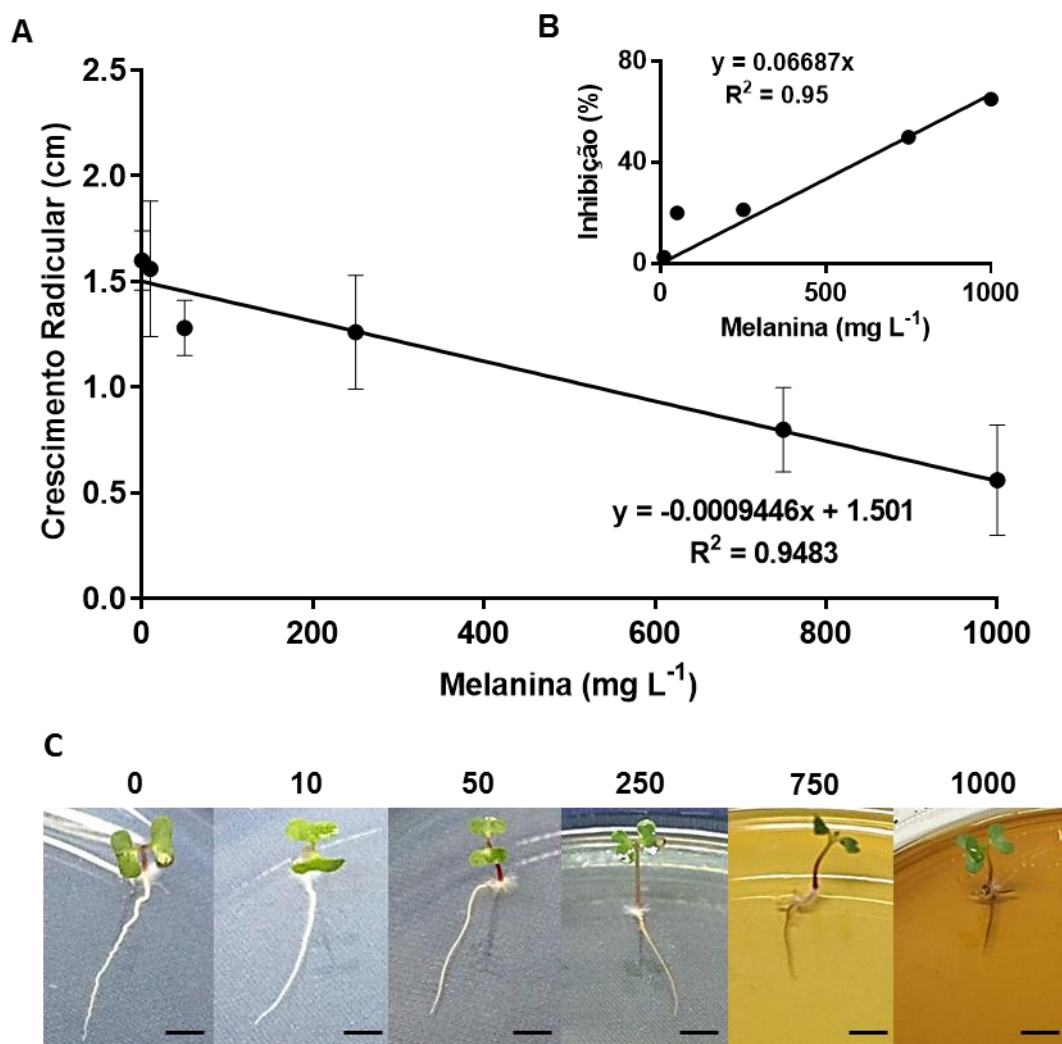
A curva padrão obtida da melanina sintética L-DOPA e da melanina exudada pelo *P. tinctorius* apresentou um perfil similar (Figuras 5A e 5B). A partir da curva padrão, foi possível quantificar a quantidade de melanina exudada no meio de cultura pelo fungo *P. tinctorius* durante o seu crescimento (Figura 5C). A quantificação demonstrou uma produção crescente de melanina de acordo com o crescimento do fungo, com dois picos de produção nos dias 15 e 88.



**Figura 5.** Curva padrão da (A) melanina sintética L-DOPA (Sigma) e (B) melanina exudada no meio de cultura. (C) Quantificação da melanina exudada no meio de cultura líquido durante o crescimento do fungo *Pisolithus tinctorius* (n=5). Curva realizada através de regressão polinomial de quarta ordem.

#### 4.2. Efeitos da melanina no crescimento e morfologia radicular

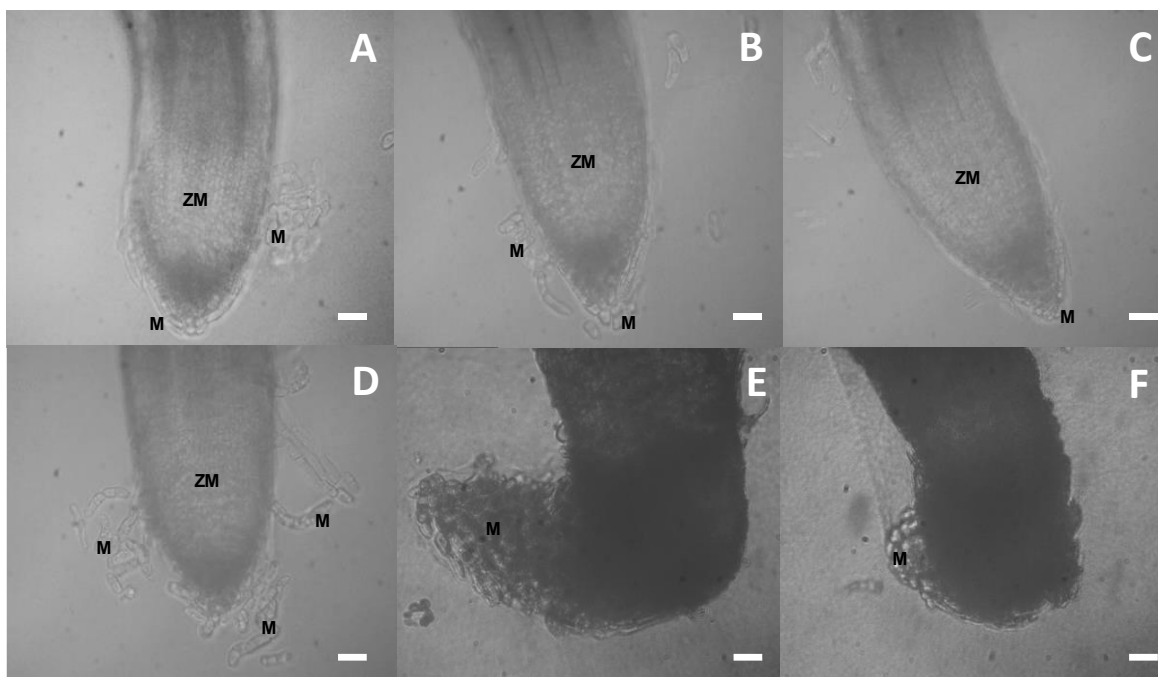
Raízes de *E. urograndis* foram medidas após 10 dias de crescimento em meio sólido adicionado de diferentes concentrações de melanina (Figura 6). O crescimento da raiz principal de *E. urograndis* foi inibido com o aumento das concentrações de melanina, principalmente nas maiores concentrações (750 e 1000 mg L<sup>-1</sup>) de melanina. Houve uma correlação negativa entre o crescimento radicular e as crescentes concentrações de melanina, uma vez que o menor comprimento radicular, com 65 % de inibição, foi observado na maior concentração de melanina (1000 mg L<sup>-1</sup>) (Figuras 6A e B). Foi possível observar que a coloração do meio se tornou mais escura e o crescimento radicular foi inibido com o aumento gradativo das concentrações de melanina (Figura 6C).



**Figura 6.** (A) Comprimento radicular da raiz principal de *Eucalyptus urograndis* crescido em diferentes concentrações da melanina exudada pelo fungo *Pisolithus tinctorius* no meio de cultura. As raízes foram medidas 10 dias após o plantio (n=5). (B) Porcentagem de inibição do crescimento radicular. (C) Imagens de plantas de *Eucalyptus urograndis* crescidas em meio sólido com diferentes concentrações da melanina exudada pelo fungo *Pisolithus tinctorius* no meio de cultura. Barras representam 300  $\mu$ m.

Altas concentrações de melanina também provocaram mudanças morfológicas nas raízes de *E. urograndis* (Figura 7). Nas concentrações de 750 e 1000 mg L<sup>-1</sup> de melanina a ponta da raiz possui maior quantidade de mucilagem (M), além de uma forma arredondada e nenhuma distinção da zona meristemática (ZM), quando comparada às menores concentrações (Figura 7). Houve também, nestas concentrações, uma completa inibição dos pelos radiculares (Figuras 8A e B), uma reduzida formação de raízes laterais, em que nas concentrações de 750 e 1000 mg L<sup>-1</sup> de melanina, as raízes laterais se apresentavam no início de sua

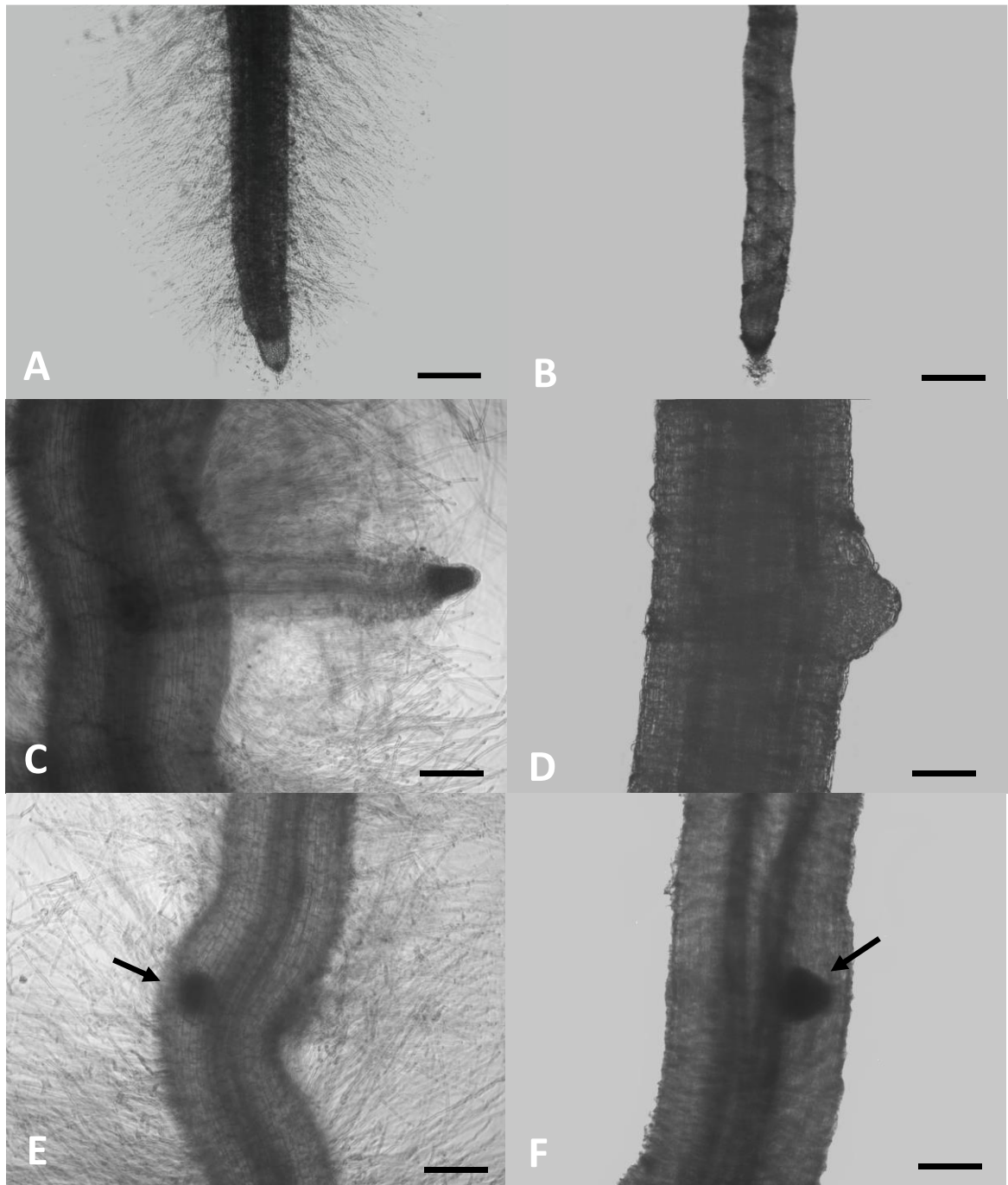
formação (Figuras 8C e D); no entanto, a formação de sítios mitóticos não foi significativamente alterada pelas altas concentrações de melanina (Figuras 8E e F), com uma média ( $n=10$ ) de 2,67 e 2,25 sítios mitóticos por raiz, para as raízes crescidas nas concentrações de 0 ou 750 mg L<sup>-1</sup> de melanina, respectivamente.



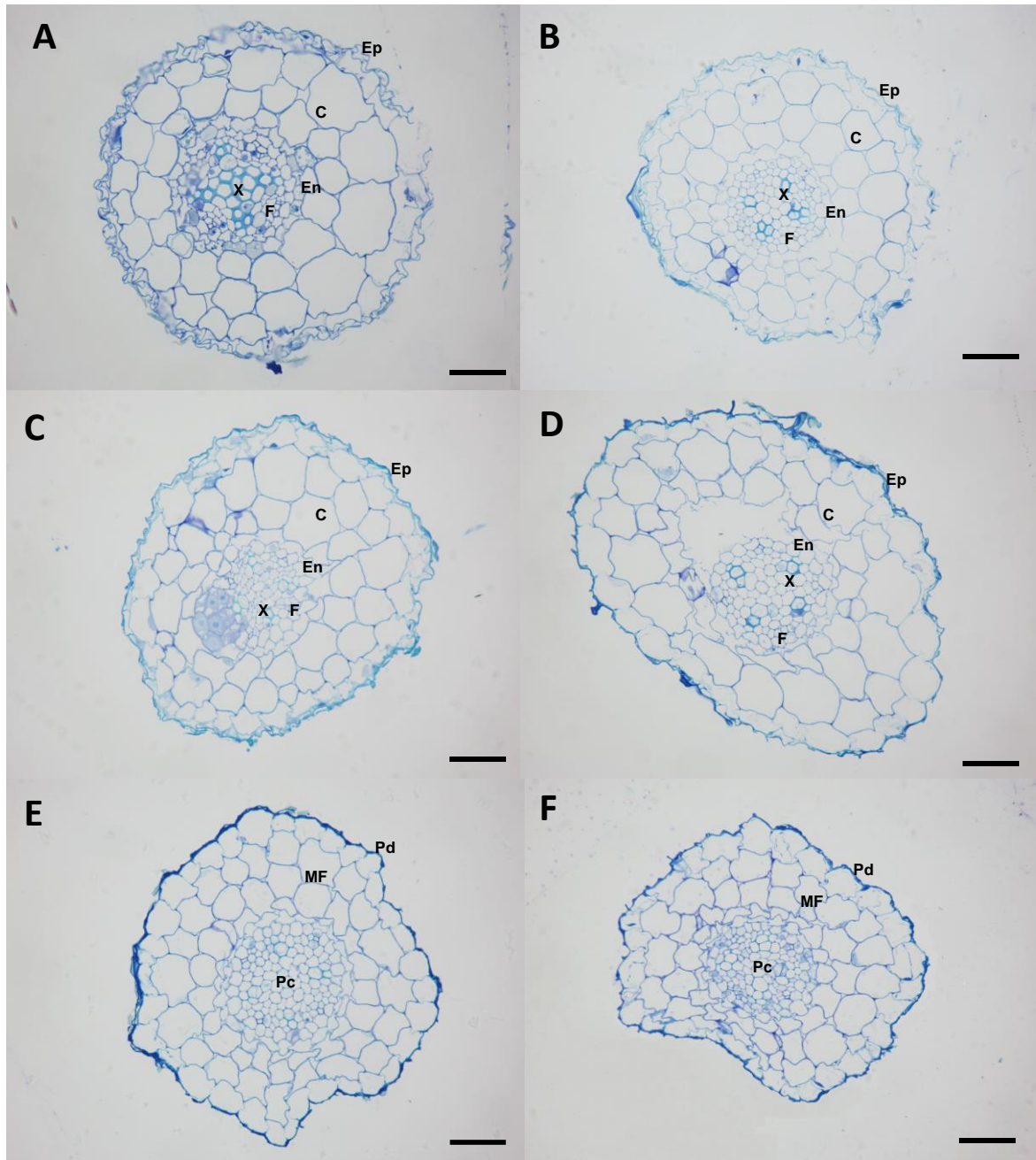
**Figura 7.** Imagens de microscopia óptica (aumento x10) mostrando a zona apical da raiz principal de *Eucalyptus urograndis* crescido em meio sólido com diferentes concentrações da melanina exudada no meio de cultura do fungo *Pisolithus tinctorius*. (a) 0 mg L<sup>-1</sup> (b) 10 mg L<sup>-1</sup> (c) 50 mg L<sup>-1</sup> (d) 250 mg L<sup>-1</sup> (e) 750 mg L<sup>-1</sup> (f) 1000 mg L<sup>-1</sup>. Barras representam 20 μm. ZM=Zona Meristemática. M=Mucilagem.

Analisando os cortes transversais das raízes de *E. urograndis* crescidas por 10 dias nas diferentes concentrações de melanina, pode-se observar diferenças no grau de desenvolvimento das raízes em questão (Figura 9). Nas raízes crescidas em 0 mg L<sup>-1</sup> de melanina, o desenvolvimento primário já está completo, sendo possível identificar uma epiderme (Ep) desenvolvida ao redor da raiz, o cortex (C) com células grandes, a endoderme (En) do cilindro central, e um xilema (X) e floema (F) primários já formados (Figura 9A). Nas raízes crescidas em 10, 50 e 250 mg L<sup>-1</sup> de melanina também é possível observar a epiderme, o córtex com células grandes, a endoderme, o xilema e floema, porém nota-se que os tecidos condutores encontram-se menos desenvolvidos em relação ao tratamento 0 mg L<sup>-1</sup> (Figuras 9B, C e D).





**Figura 8.** Imagens de microscopia óptica mostrando a raiz principal de *Eucalyptus urograndis* crescido por 10 dias em (a) 0 mg L<sup>-1</sup> de melanina ou (b) 750 mg L<sup>-1</sup> de melanina. Raiz lateral de *Eucalyptus urograndis* crescido por 10 dias em (c) 0 mg L<sup>-1</sup> de melanina ou (d) 750 mg L<sup>-1</sup> de melanina. Sítios mitóticos da raiz principal de *Eucalyptus urograndis* crescido por 10 dias em (e) 0 mg L<sup>-1</sup> de melanina ou (f) 750 mg L<sup>-1</sup> de melanina. Barras representam 100 μm nas figuras a e b, e 200 μm nas figuras c, d, e, f. As setas indicam os sítios mitóticos.



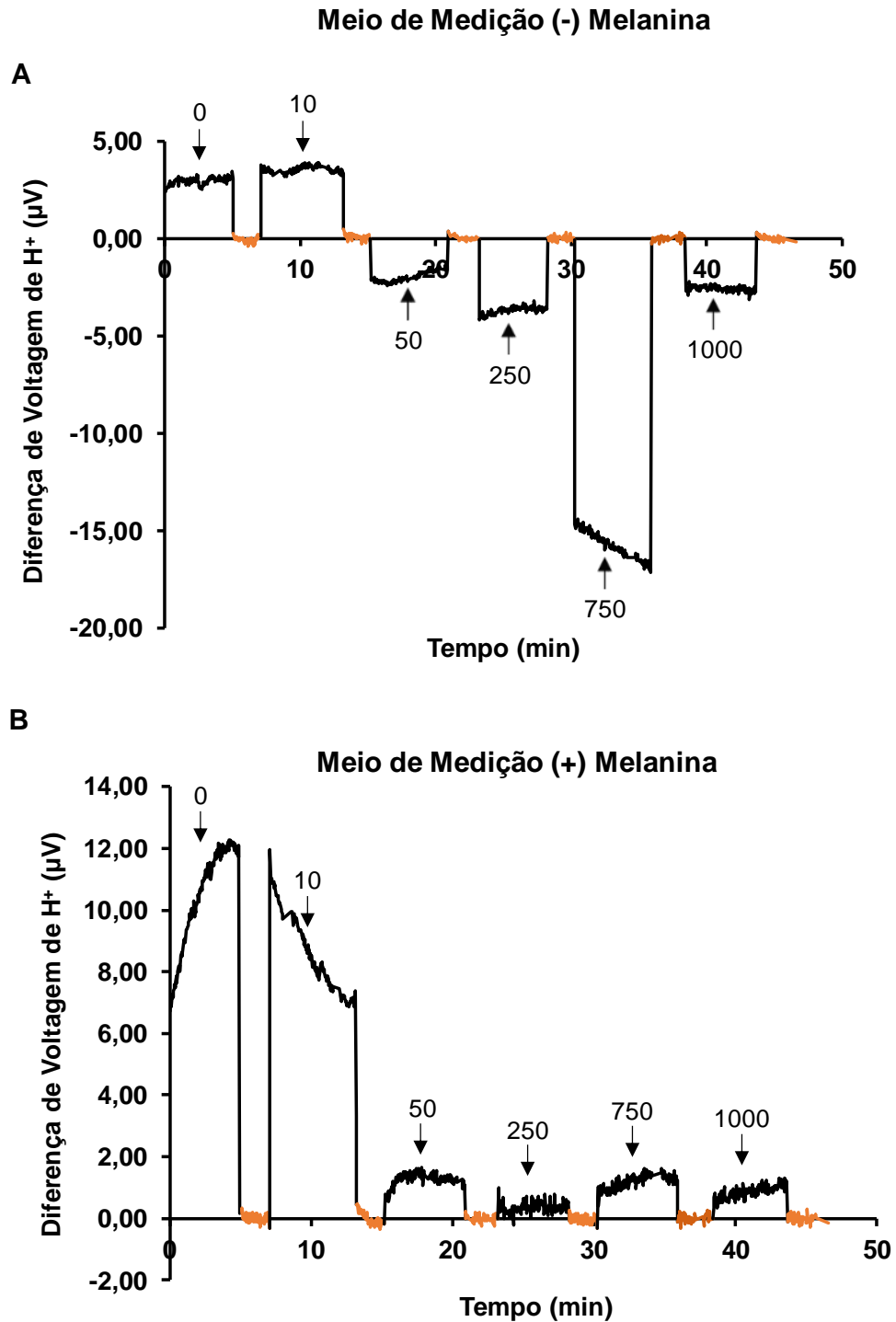
**Figura 9.** Imagens de microscopia óptica mostrando seções transversais, localizadas a 10  $\mu\text{m}$  da ponta das raízes de *Eucalyptus urograndis*, crescido por 10 dias em meio sólido, com diferentes concentrações da melanina exudada no meio de cultura do fungo *Pisolithus tinctorius*. (a) 0  $\text{mg L}^{-1}$  (b) 10  $\text{mg L}^{-1}$  (c) 50  $\text{mg L}^{-1}$  (d) 250  $\text{mg L}^{-1}$  (e) 750  $\text{mg L}^{-1}$  (f) 1000  $\text{mg L}^{-1}$ . Ep = epiderme, C = córtex, En = endoderme, F = floema primário, X = xilema primário, Pd = protoderme, MF = meristema fundamental e Pc = procâmbio. Barras representam 100  $\mu\text{m}$ .

Além disso, na raiz crescida em 250 mg L<sup>-1</sup> de melanina a epiderme está mais fina, ou seja, em início de formação, quando comparada às raízes crescidas nas menores concentrações de melanina (Figura 9D). Nos tratamentos de 750 e 1000 mg L<sup>-1</sup> de melanina, pode-se observar claramente raízes em estágio inicial do desenvolvimento primário, apresentando apenas os meristemas primários como uma protoderme (Pd) mais fina, um meristema fundamental (MF) com células menores e um procâmbio (Pc) sem diferenciação de xilema e floema (Figuras 9E e F).

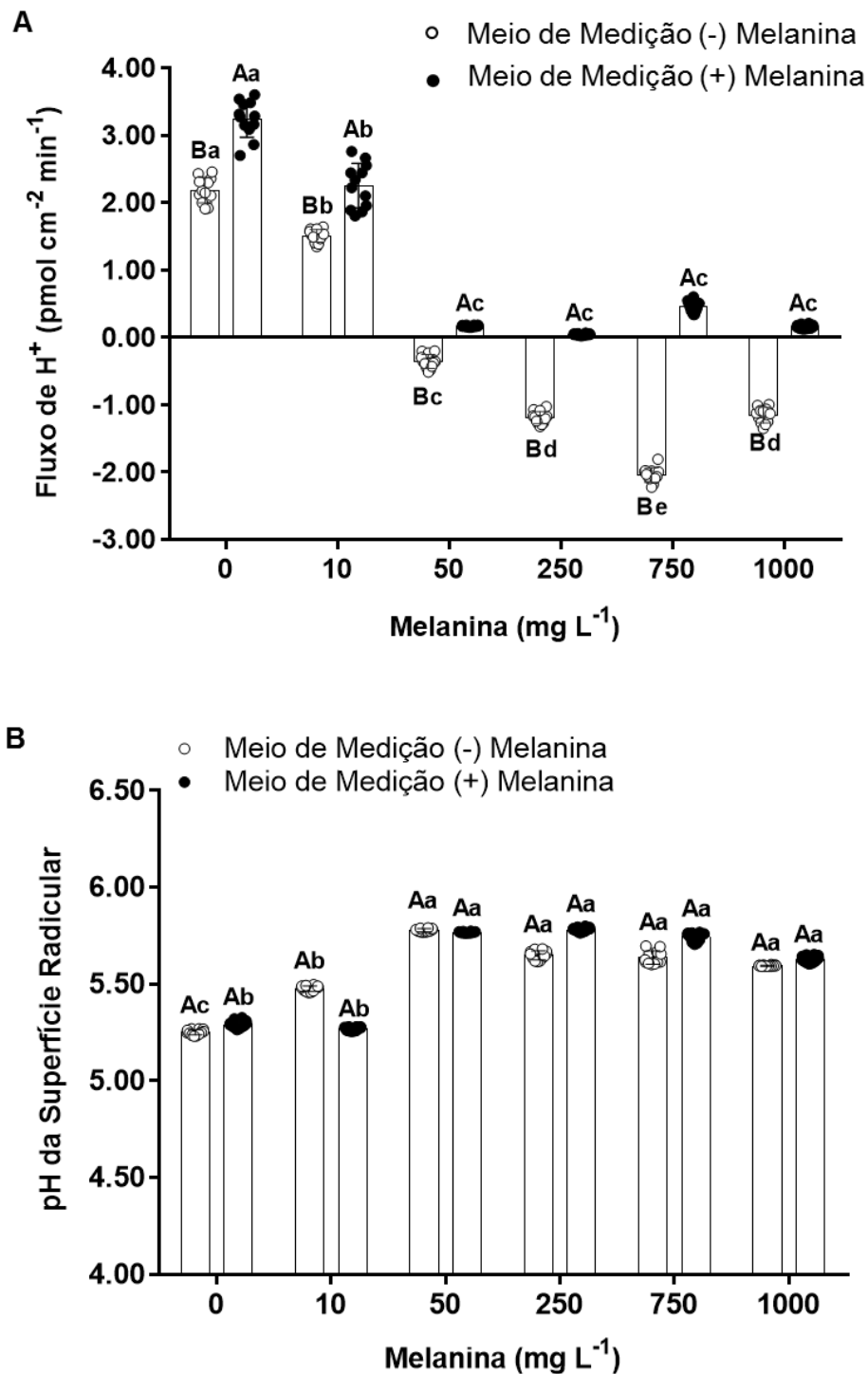
#### **4.3. Diferença de voltagem extracelular gerada pelo fluxo de H<sup>+</sup>, direção e intensidade dos fluxos de H<sup>+</sup> e pH da superfície da zona apical de raízes de *E. urograndis***

A análise da diferença de voltagem extracelular gerada pelos fluxos de H<sup>+</sup> da zona apical das raízes de *E. urograndis* demonstrou que raízes crescidas nas concentrações de melanina acima de 50 mg L<sup>-1</sup>, tiveram sua diferença de microvolt inibida (Figura 10). Medidas da voltagem transmembranar na ausência de melanina, em todos os tratamentos acima de 10 mg L<sup>-1</sup>, apresentaram apenas correntes negativas (Figura 10A). Porém, na presença de melanina só foram detectadas correntes positivas, além disso foi observada uma inibição pronunciada, de 88, 96, 88 e 91 %, para as concentrações acima de 50 mg L<sup>-1</sup> de melanina, respectivamente (Figura 10B).

Os fluxos de H<sup>+</sup> foram inibidos pela melanina, tanto na presença quanto na ausência de melanina no meio de medição, com diferenças significativas (P<0,0001) registradas entre as duas condições de medição do fluxo de H<sup>+</sup> para todas as concentrações de melanina (Figura 11A). Na ausência de melanina no meio de aferição, foi observada uma inversão do fluxo de H<sup>+</sup> a partir da concentração de 50 mg L<sup>-1</sup>. Somente concentrações superiores a 10 mg L<sup>-1</sup> foram capazes de converter em influxo o perfil de efluxo de H<sup>+</sup> do tratamento 0 mg L<sup>-1</sup>. Porém, mesmo nesta baixa concentração de melanina o efluxo foi significativamente (P<0,0001) menor ao do tratamento 0 mg L<sup>-1</sup>. Nas concentrações mais altas, foram detectados somente influxos de H<sup>+</sup>, com o maior influxo (-2.03 ± 0.05 pmol cm<sup>-2</sup> min<sup>-1</sup>) registrado com 750 mg L<sup>-1</sup> de melanina.



**Figura 10.** (A) Representação gráfica da diferença de microvolt de  $H^+$  detectada na zona apical da raiz principal de *Eucalyptus urograndis* crescido em diferentes concentrações de melanina. A diferença de microvolt foi medida na condição de meio de medição (-) melanina. (B) Representação gráfica da diferença de microvolt de  $H^+$  detectada na zona apical da raiz principal de *Eucalyptus urograndis* crescido em diferentes concentrações de melanina. A diferença de microvolt foi medida na condição de meio de medição (+) melanina. As linhas laranjas representam os valores da referência, os quais são medidos a 1 cm de distância das raízes, a fim de demonstrar que os fluxos medidos são verdadeiros, e não uma interferência do meio.



**Figura 11.** (A) Fluxos de H<sup>+</sup> na zona apical da raiz principal de *Eucalyptus urograndis* crescido em meio sólido com diferentes concentrações de melanina. (B) pH da superfície na zona apical da raiz principal de *Eucalyptus urograndis* crescido em meio sólido com diferentes concentrações de melanina. Círculos claros representam o fluxo de H<sup>+</sup> e o pH da superfície medidos na condição de meio de medição (-) melanina. Círculos escuros representam o fluxo de H<sup>+</sup> e o pH da superfície medidos na condição de meio de medição (+) melanina. Barras representam os valores das médias  $\pm$  DP de três experimentos independentes. Para cada concentração de melanina, as barras seguidas da mesma letra em

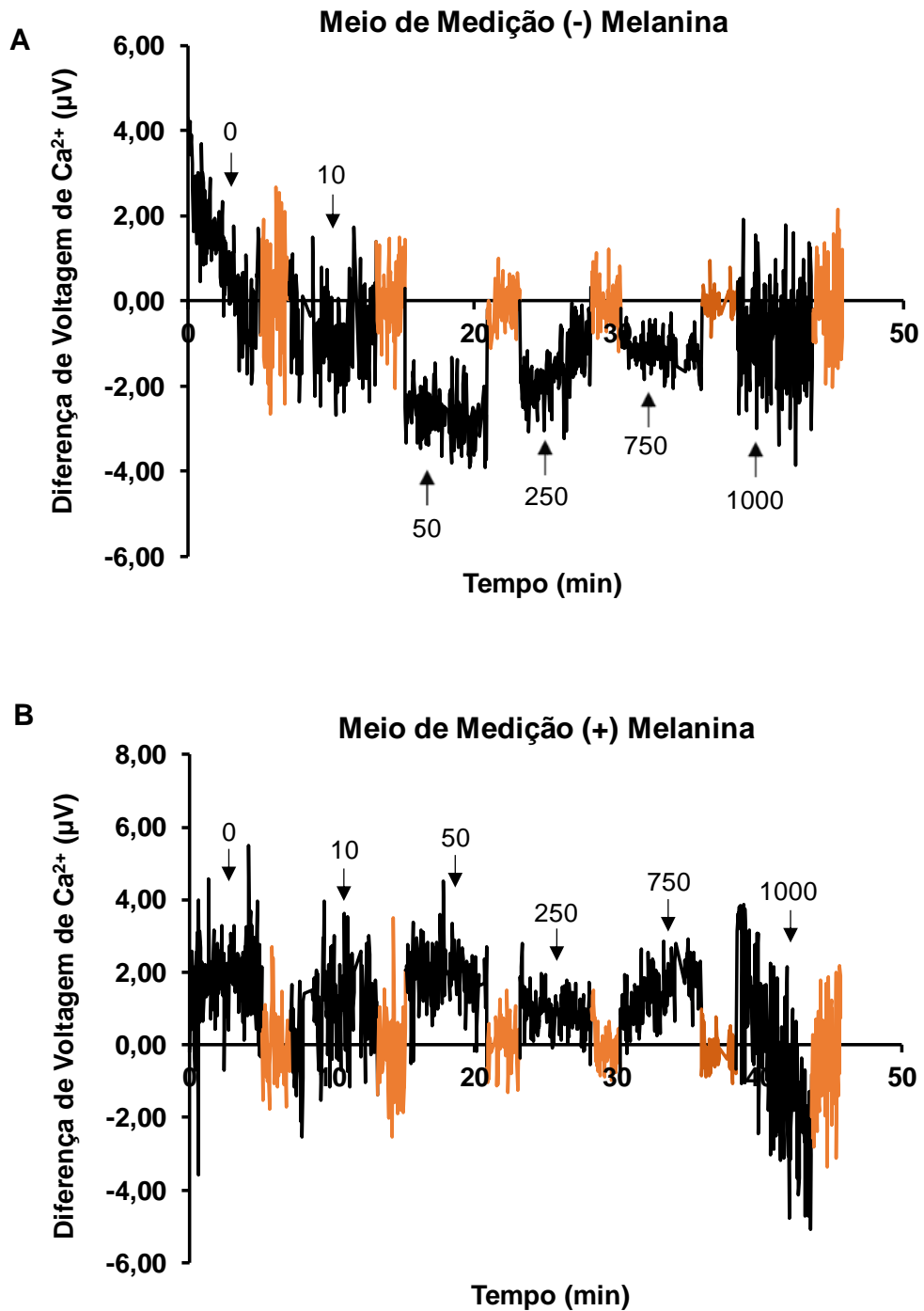
maiúsculo, nas diferentes condições de medição, não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a  $p < 0,05$ . Para cada condição de medição, barras seguidas da mesma letra em minúsculo, nas diferentes concentrações de melanina, não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a  $p < 0,05$ . Círculos representam 4 pontos de medição de cada experimento realizado, com um total de 3 experimentos, totalizando  $n=12$ .

Também houve uma inibição do fluxo de  $H^+$  na presença de melanina no meio de medição dos fluxos (Figura 11A). No entanto, não foi registrado nenhum domínio de influxo de  $H^+$ . Uma inibição significativa ( $P < 0,0001$ ) do fluxo foi observada a partir da concentração de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  quando comparada ao tratamento  $0 \text{ mg L}^{-1}$ , sendo que não houve diferença significativa entre as concentrações de  $50, 250, 750$  e  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de melanina.

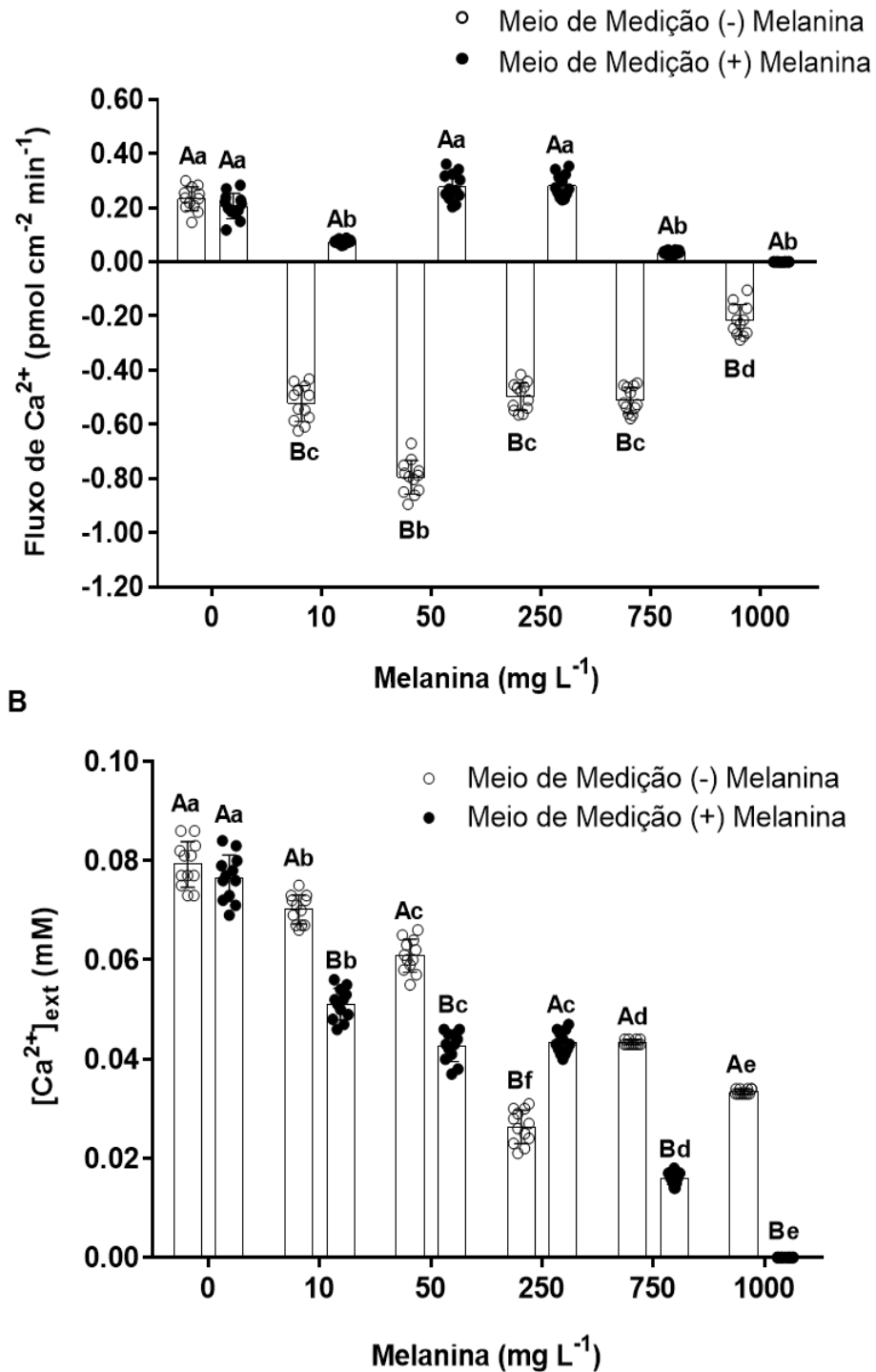
Os valores de pH da superfície na zona apical da raiz aumentaram significativamente ( $P < 0,0001$ ) em raízes tratadas com  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de melanina, quando a medição ocorreu na ausência de melanina, e a partir de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  na presença de melanina (Figura 11B), o que está de acordo com a inibição dos fluxos de  $H^+$  observada. Não houve diferença significativa ( $P < 0,0001$ ) dos valores de pH da superfície da raiz entre as duas condições de meio de medição, para todas as concentrações de melanina.

#### **4.4. Diferença de voltagem extracelular de $Ca^{2+}$ , fluxos de $Ca^{2+}$ e concentração extracelular de $Ca^{2+}$ na zona apical de raízes de *E. urograndis***

Todas as concentrações de melanina a que as raízes foram expostas provocaram uma inibição da diferença de voltagem extracelular de  $Ca^{2+}$  na zona apical das raízes de *E. urograndis* (Figura 12). Nas medidas realizadas sem a presença de melanina no meio de aferição, os tratamentos de  $10$  a  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  exibiram uma média de correntes negativa, que quando comparada ao tratamento  $0 \text{ mg L}^{-1}$ , foi menor em todos os tratamentos (Figure 12A). Na condição de meio de medição (+) melanina, somente foram registradas correntes positivas, exceto para a concentração de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de melanina que apresentou voltagens variando entre  $3,84 \mu\text{V}$  e  $-5,08 \mu\text{V}$  (Figura 12B).



**Figura 12.** (A) Representação gráfica da diferença de microvolt de  $\text{Ca}^{2+}$  detectada na zona apical da raiz principal de *Eucalyptus urograndis* crescido em diferentes concentrações de melanina. A diferença de microvolt foi medida na condição de meio de medição (-) melanina. (B) Representação gráfica da diferença de microvolt de  $\text{Ca}^{2+}$  detectada na zona apical da raiz principal de *Eucalyptus urograndis* crescido em diferentes concentrações de melanina. A diferença de microvolt foi medida na condição de meio de medição (+) melanina. As linhas laranjas representam os valores da referência, os quais são medidos a 1 cm de distância das raízes, a fim de demonstrar que os fluxos medidos são verdadeiros, e não uma interferência do meio.



**Figura 13.** (A) Fluxos de  $\text{Ca}^{2+}$  na zona apical da raiz principal de *Eucalyptus urograndis* crescido em meio sólido com diferentes concentrações de melanina. (B) Concentração extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  na zona apical da raiz principal de *Eucalyptus urograndis* crescido em meio sólido com diferentes concentrações de melanina. Círculos claros representam o fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e a concentração extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  medidos na condição de meio de medição (-) melanina. Círculos escuros representam o fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e a concentração extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  medidos na condição de meio de medição (+) melanina. Barras representam os valores das médias  $\pm$  DP de três experimentos independentes. Para cada concentração de melanina, as barras seguidas da mesma letra em maiúsculo, nas



diferentes condições de medição, não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a  $p < 0,05$ . Para cada condição de medição, barras seguidas da mesma letra em minúsculo, nas diferentes concentrações de melanina, não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a  $p < 0,05$ . Círculos representam 4 pontos de medição de cada experimento realizado, com um total de 3 experimentos, totalizando  $n=12$ .

O fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  foi inibido pela melanina nas duas condições de medição (Figura 13A). Na condição em que a medição foi efetuada sem melanina, raízes tratadas com todas as concentrações de melanina geraram domínios de influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , enquanto raízes crescidas em  $0 \text{ mg L}^{-1}$  de melanina apresentaram efluxos da ordem de  $0,23 \pm 0,1 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ . Com o aumento gradativo das concentrações de melanina nos tratamentos realizados no cultivo das plantas, o influxo foi reduzindo, com o mínimo ( $-0,21 \pm 0,4 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ ) registrado em  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ .

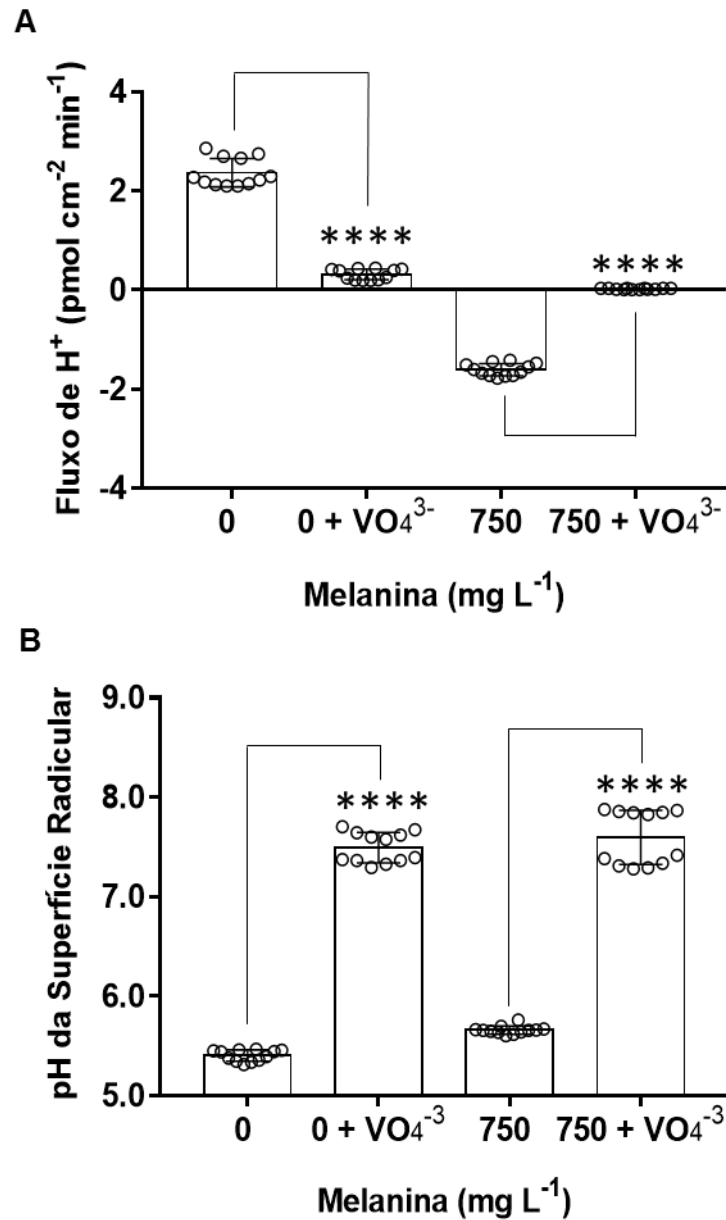
Houve diferença significativa ( $P < 0,0001$ ) em todas as concentrações de melanina quando comparadas ao tratamento  $0 \text{ mg L}^{-1}$ . Na condição de medição efetuada na presença de melanina, não houve nenhum domínio de influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , porém houve uma inibição significativa ( $P < 0,0001$ ) do efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  nos tratamentos com as concentrações de  $10, 750$  e  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de melanina, com destaque para a última concentração em que o fluxo foi completamente inibido.

A melanina também modificou a concentração extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 13B). Na condição de medição feita na ausência de melanina, a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  permaneceu próxima à concentração originalmente utilizada no meio nutriente adaptado para baixo sal ( $0,086 \text{ mM}$ ), em raízes de plantas não tratadas com melanina. No entanto, em todos os tratamentos com melanina, a concentração extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  foi significativamente ( $P < 0,0001$ ) reduzida, variando entre  $0,067$  a  $0,023 \text{ mM}$ , compatível com os influxos de  $\text{Ca}^{2+}$  previamente registrados. Nas análises feitas na presença de melanina, houve uma redução significativa ( $P < 0,0001$ ) e drástica da concentração extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  em todos os tratamentos com melanina, chegando a zero no tratamento com  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de melanina. Não foi detectado nenhum influxo na condição de medição efetuada na presença de melanina, em todos os tratamentos.

#### **4.5. Medição dos fluxos de H<sup>+</sup> e pH da superfície da zona apical de raízes de *E. urograndis* na presença de vanadato (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>)**

Foram medidos os fluxos de H<sup>+</sup> e o pH da superfície da zona apical das plantas crescidas em 0 mg L<sup>-1</sup> ou 750 mg L<sup>-1</sup> de melanina na presença ou não de vanadato (Figura 14). Houve uma inibição significativa (P<0,0001) de 86 % no fluxo de H<sup>+</sup> das plantas crescidas em 0 mg L<sup>-1</sup> de melanina tratadas com vanadato em relação às mesmas plantas não tratadas (Figura 14A). Já nas plantas crescidas em 750 mg L<sup>-1</sup> de melanina, houve uma inibição significativa (P<0,0001) de 98,76 % no fluxo de H<sup>+</sup> das plantas tratadas com vanadato em relação às plantas não tratadas (Figura 14A).

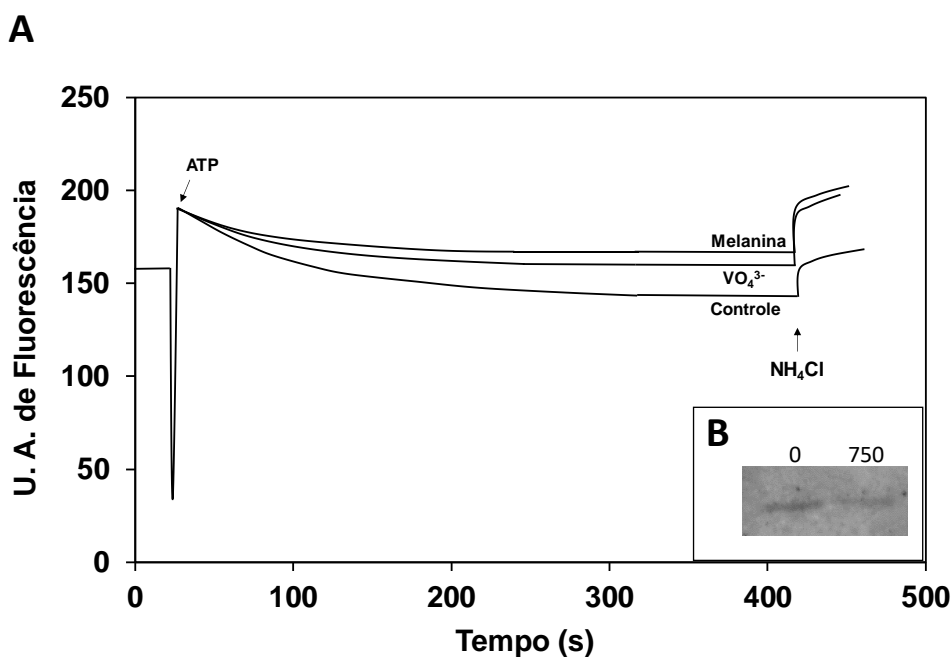
O pH da superfície da zona apical se tornou mais básico na presença do vanadato para as duas concentrações de melanina (Figura 14B). Nas plantas crescidas em 0 mg L<sup>-1</sup>, houve um aumento significativo (P<0,0001) do pH na presença do vanadato, em que este passou de 5,41 para 7,50. Nas plantas tratadas com 750 mg L<sup>-1</sup> de melanina também houve um aumento significativo (P<0,0001) do pH na presença do vanadato, em que este passou de 5,66 para 7,60.



**Figura 14.** Medições do fluxo de  $H^+$  na raiz principal de *Eucalyptus urograndis*, dez dias após o plantio, utilizando uma sonda vibrátil específica para  $H^+$ . (A) Fluxos de  $H^+$  na zona apical da raiz principal de *Eucalyptus urograndis* crescido em meio sólido com 0 ou  $750 \text{ mg L}^{-1}$  de melanina ( $n=12$ ). (B) pH da superfície na zona apical da raiz principal de *Eucalyptus urograndis* crescido em meio sólido com 0 ou  $750 \text{ mg L}^{-1}$  de melanina ( $n=12$ ). Vanadato ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) foi aplicado na concentração final de  $100 \mu\text{M}$ . \*\*\*\*Representam diferença significativa pelo teste t de Student ( $P < 0,0001$ ).

#### 4.6. Atividade hidrolítica, atividade de bombeamento de H<sup>+</sup> e expressão das P-H<sup>+</sup>-ATPases isoladas das raízes de *E. urograndis*

As vesículas microsossomais das raízes de *E. urograndis* foram isoladas através de fracionamento celular e foram incubadas com 0 ou 750 mg L<sup>-1</sup> de melanina, antes da medição atividade de bombeamento H<sup>+</sup> ou de hidrólise do ATP das P-H<sup>+</sup>-ATPases. A atividade de bombeamento de H<sup>+</sup> foi menor nas vesículas incubadas com melanina (Figura 15A). Uma inibição da atividade de bombeamento de H<sup>+</sup> também foi observada nas vesículas incubadas com vanadato (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), um conhecido inibidor das P-H<sup>+</sup>-ATPase (Figura 15A). O tratamento com melanina inibiu aproximadamente 42 % da velocidade inicial (V<sub>0</sub>) e 78 % do ΔFmáx do bombeamento de H<sup>+</sup> das P-H<sup>+</sup>-ATPases (Figura 15C).



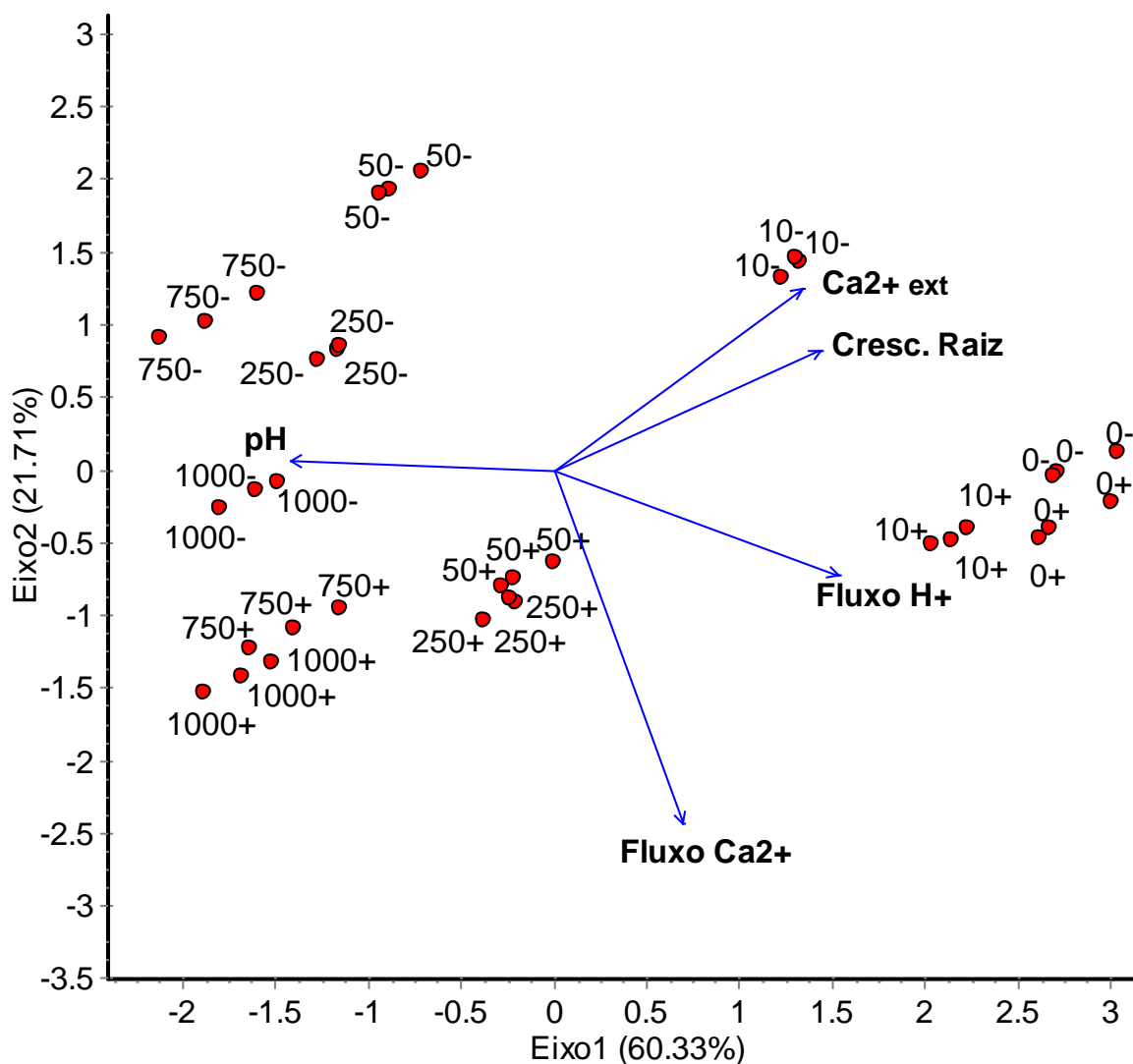
**C**

Tratamento	V <sub>0</sub> (%)	ΔFmáx (%)	Atividade Hidrolítica P-H <sup>+</sup> -ATPase (μmol mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	Taxa de Acoplamento
Controle	7.84	21.10	0.73	10.74
Melanina	4.54	9.89	0.79	5.75

**Figura 15.** (A) Atividade de bombeamento de  $H^+$  das vesículas contendo as P-H<sup>+</sup>-ATPases isoladas das raízes de *Eucalyptus urograndis*. As vesículas foram incubadas com melanina (750 mg L<sup>-1</sup>) ou com Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> por 5 min antes do início da atividade. A translocação de  $H^+$  pela membrana foi monitorada através do quenching da fluorescência do ACMA na presença de 30 µg de proteína. A reação teve início com a adição de ATP 1 mM e foi parada com NH<sub>4</sub>Cl 20 mM. U.A. = Unidades Arbitrárias. (B) Imunoresposta da P-H<sup>+</sup>-ATPase em amostras da fração microssomal extraídas das raízes de *E. urograndis* crescidas em 0 ou 750 mg L<sup>-1</sup> de melanina. (C) Comparação entre a velocidade inicial ( $V_0$ ) da atividade de bombeamento de  $H^+$  da P-H<sup>+</sup>-ATPase, a diferença da fluorescência máxima ( $\Delta F_{m\acute{a}x}$ ), a atividade hidrolítica do ATP ( $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) e a taxa de acoplamento ( $V_0$  do bombeamento de  $H^+$ /hidrólise do ATP) das vesículas contendo as P-H<sup>+</sup>-ATPases isoladas das raízes de *Eucalyptus urograndis*, incubadas ou não com melanina (750 mg L<sup>-1</sup>) por 5 min, antes do início das reações (n=3).

#### 4.7. Análise de componente principal

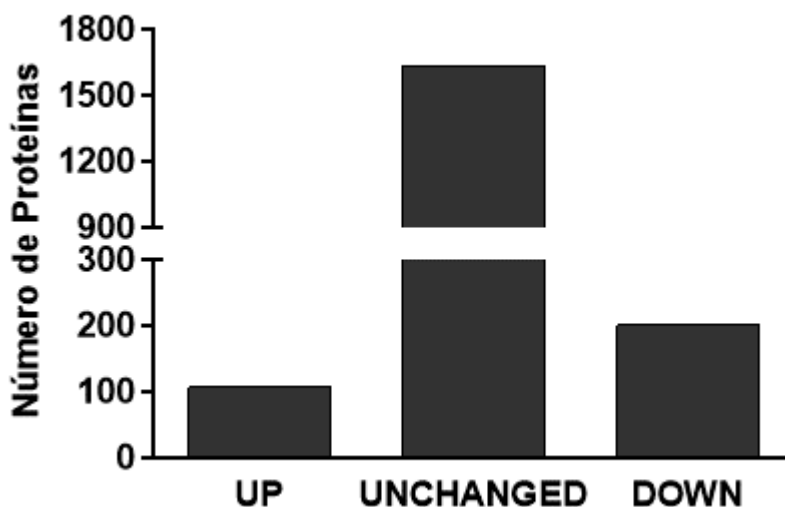
A análise de componente principal foi realizada para descobrir as possíveis relações entre o crescimento radicular, os fluxos de  $H^+$  e  $Ca^{2+}$ , o pH da superfície radicular e a concentração extracelular de  $Ca^{2+}$  nas diferentes condições de meio de medição (Figura 16). O fluxo de  $H^+$ , o crescimento radicular e a concentração de  $Ca^{2+}$  extracelular estão relacionados com baixas concentrações de melanina (0, 10 e 50 mg L<sup>-1</sup>), nas duas condições de medição. O fluxo de  $Ca^{2+}$  também está mais próximo das menores concentrações de melanina nas duas condições de medição, exceto para as concentrações de 50 e 250 mg L<sup>-1</sup> de melanina, no meio de medição (-) melanina, que se encontram opostas ao fluxo de  $Ca^{2+}$ . Já o pH da superfície radicular encontra-se relacionado com altas concentrações de melanina (750 e 1000 mg L<sup>-1</sup>). De fato, altas concentrações de melanina inibiram o crescimento radicular e os fluxos de  $H^+$  e  $Ca^{2+}$ , além de terem provocado uma redução do  $Ca^{2+}$  extracelular e um aumento do pH da superfície da raiz.



**Figura 16.** Análise de PCA do crescimento radicular, fluxos de  $H^+$  e  $Ca^{2+}$ ,  $[Ca^{2+}]_{ext}$  e pH da superfície na zona apical da raiz principal de *Eucalyptus urograndis*, crescido em diferentes concentrações de melanina (0, 10, 50, 250, 750 ou 1000  $mg L^{-1}$ ). As medições foram realizadas em meio de medição (-) melanina ou meio de medição (+) melanina.

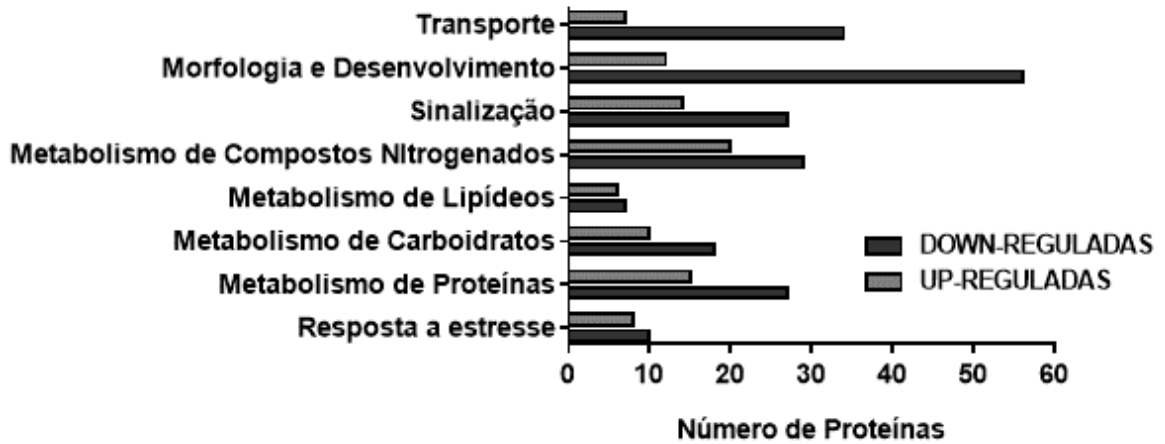
#### 4.8. Análise proteômica das raízes de *E. urograndis* crescidas com melanina

Com a análise proteômica foi possível determinar se a melanina exudada pelo fungo *P. tinctorius* poderia modificar quantitativamente o proteoma das raízes de *E. urograndis*. Foi identificado um total de 1943 proteínas, em que 107 foram mais abundantes, 200 foram menos abundantes e 1636 proteínas não foram alteradas na presença da melanina em relação ao tratamento 0  $mg L^{-1}$  de melanina (Figura 17).

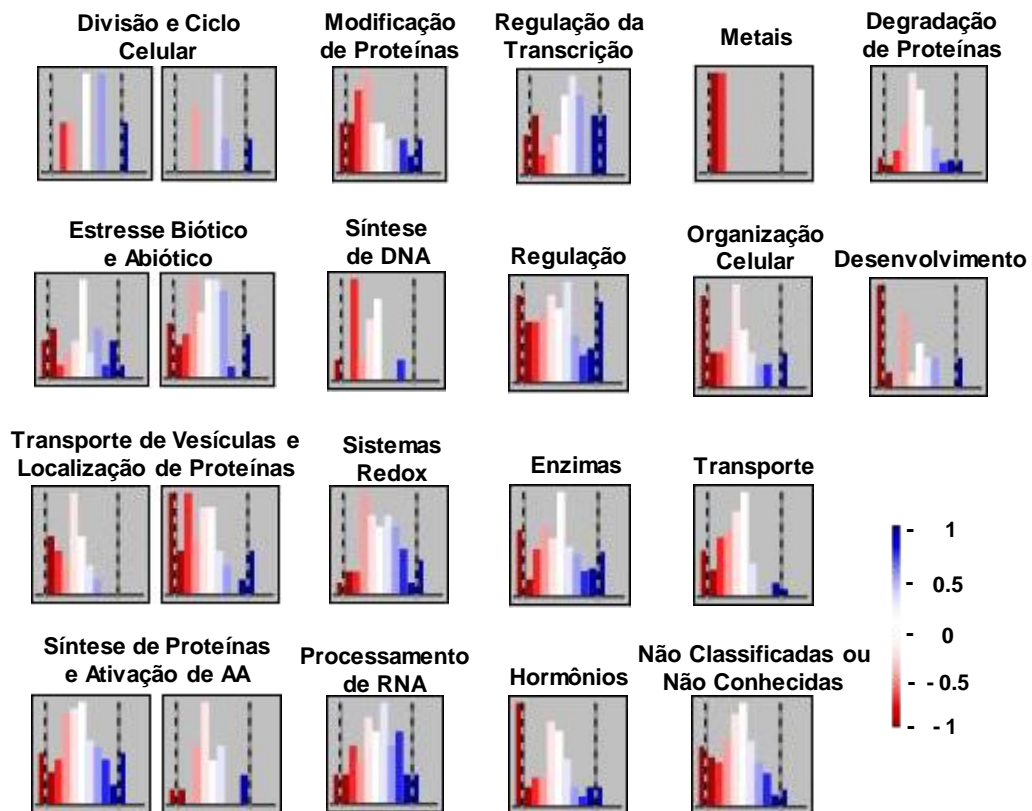


**Figura 17.** Número de proteínas up e down reguladas ou que não sofreram alteração na abundância, identificadas em raízes de *Eucalyptus urograndis*, crescido por 10 dias em meio sólido contendo 0 ou 750 mg L<sup>-1</sup> de melanina. Proteínas down-reguladas: Ao menos duas vezes menos abundantes no tratamento com 750 mg L<sup>-1</sup> de melanina quando comparado ao tratamento 0 mg L<sup>-1</sup> de melanina. Proteínas up-reguladas: Ao menos duas vezes mais abundantes no tratamento com 750 mg L<sup>-1</sup> de melanina quando comparado ao tratamento 0 mg L<sup>-1</sup> de melanina.

As proteínas mais e menos abundantes reguladas pela presença da melanina foram submetidas a uma análise funcional e foram classificadas em 8 classes principais: transporte, morfologia e desenvolvimento, sinalização, metabolismo de compostos nitrogenados, metabolismo de lipídios, metabolismo de carboidratos, metabolismo de proteínas e resposta a estresse (Figura 18). As proteínas menos abundantes estavam em maioria em todas as classes funcionais. Em uma análise mais detalhada, o mapeamento de proteínas revelou as principais categorias funcionais das proteínas reguladas pela melanina (Figura 19). Analisando as categorias de respostas celulares, foi possível observar que o maior número de proteínas reguladas está envolvido em organização celular, síntese, modificação e sinalização de proteínas, estresse biótico e abiótico, desenvolvimento, interações hormonais, regulação e transporte.



**Figura 18.** Análise funcional das proteínas identificadas utilizando a plataforma blast2go, indicando os principais grupos de proteínas regulados em raízes de *Eucalyptus urograndis* crescido por 10 dias em meio sólido na presença de 750 mg L<sup>-1</sup> de melanina.



**Figura 19.** Mapeamento da regulação das proteínas do metabolismo geral celular, em raízes de *Eucalyptus urograndis*, crescido por 10 dias em meio sólido contendo 0 ou 750 mg L<sup>-1</sup> de melanina. O log<sub>2</sub> do FC foi usado para determinar o nível de abundância de cada proteína. Proteínas up-reguladas (log<sub>2</sub> > 1) são indicadas em azul e proteínas down-reguladas (log<sub>2</sub> < -1) são indicadas em vermelho.



A Tabela 1 mostra uma lista com as proteínas discutidas neste trabalho e que pertencem às categorias de estresse biótico, metabolismo de carboidratos e transporte.

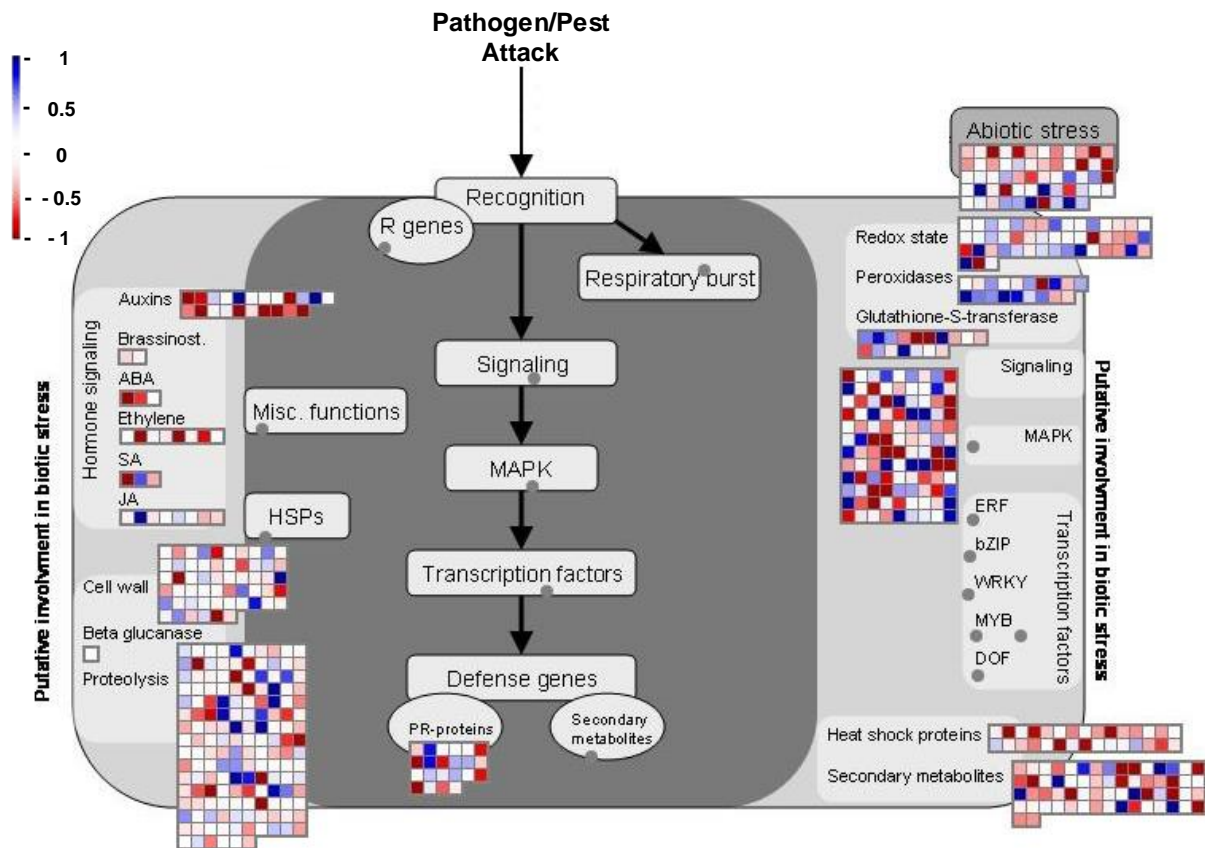
**Tabela 1.** Proteínas que foram up ou down reguladas, em raízes de *Eucalyptus urograndis*, crescido por 10 dias em meio sólido, na presença de 750 mg L<sup>-1</sup> de melanina quando comparado ao tratamento 0 mg L<sup>-1</sup> de melanina. O log<sub>2</sub> do fold change (FC) foi usado para determinar o nível de abundância de cada proteína. Proteínas com abundância diferencial foram consideradas up-reguladas quando o log<sub>2</sub> do FC > 1 e down-reguladas quando log<sub>2</sub> < -1.

Acesso	Contagem de Peptídeo	Confidence Score	Descrição	Log <sub>2</sub> _FC
<b>Estresse Biótico</b>				
Sinalização de Hormônios				
Eucgr.K00046.1 PACid:23601415	5	28,5866	IAA-leucine-resistant (ILR1)-like 3 (ILL3)	-1,98748
Eucgr.H00466.1 PACid:23589824	10	97,6868	ATB2	-1,92582
Eucgr.C02919.1 PACid:23572380	1	11,7226	epoxycarotenoid dioxygenase	-2,27567
Eucgr.H03330.1 PACid:23592638	1	5,7465	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases	-1,34714
Eucgr.I00885.1 PACid:23595383	4	28,8205	2OG-Fe(II)-dependent oxygenase	-1,38076
Defesa contra ataque de patógenos (PR Proteins)				
Eucgr.D00276.1 PACid:23574043	2	12,9884	disease-resistance-responsive (dirigent-like) protein	-1,55204
Eucgr.C00271.1 PACid:23569784	4	28,1255	disease-resistance protein (TIR-NBS-LRR class)	-1,17991
Formação de Parede Celular				
Eucgr.I01731.1 PACid:23596406	6	43,6272	glucuronokinase G	-1,32908
Eucgr.A01397.1 PACid:23563156	24	246,0344	caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase	-1,42755
Eucgr.E01137.1 PACid:23577854	6	70,016	Actin 7	-3,16977
Eucgr.D00655.1 PACid:23574430	4	21,0135	MAP215 family of microtubule-associated proteins	-2,76426
Eucgr.K01823.2 PACid:23603315	1	5,9193	Tubulin binding cofactor C domain-containing protein	-1,15223
Regulação e Sinalização Celular				
Eucgr.F04436.1 PACid:23585705	2	11,5757	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	-2,70821
Eucgr.C00635.1 PACid:23570140	1	6,279	Protein phosphatase 2C family protein	1,985872
<b>Transporte</b>				
Eucgr.F03585.1 PACid:23584711	2	11,9174	TMT2	-1,52417
Eucgr.I01429.2 PACid:23596012	2	11,6612	proteínas intrínsecas de membrana plasmática (PIP)	-1,02825
Eucgr.A01453.1 PACid:23563225	17	118,2994	H(+)-ATPase 5 (HA5)	-1,43504
Eucgr.G01943.1 PACid:23587518	7	53,2083	subunit C of the vacuolar H(+)-ATPase (V-ATPase)	1,081658
Eucgr.F01995.1 PACid:23582745	2	11,1709	Sec14p-like	-2,16209

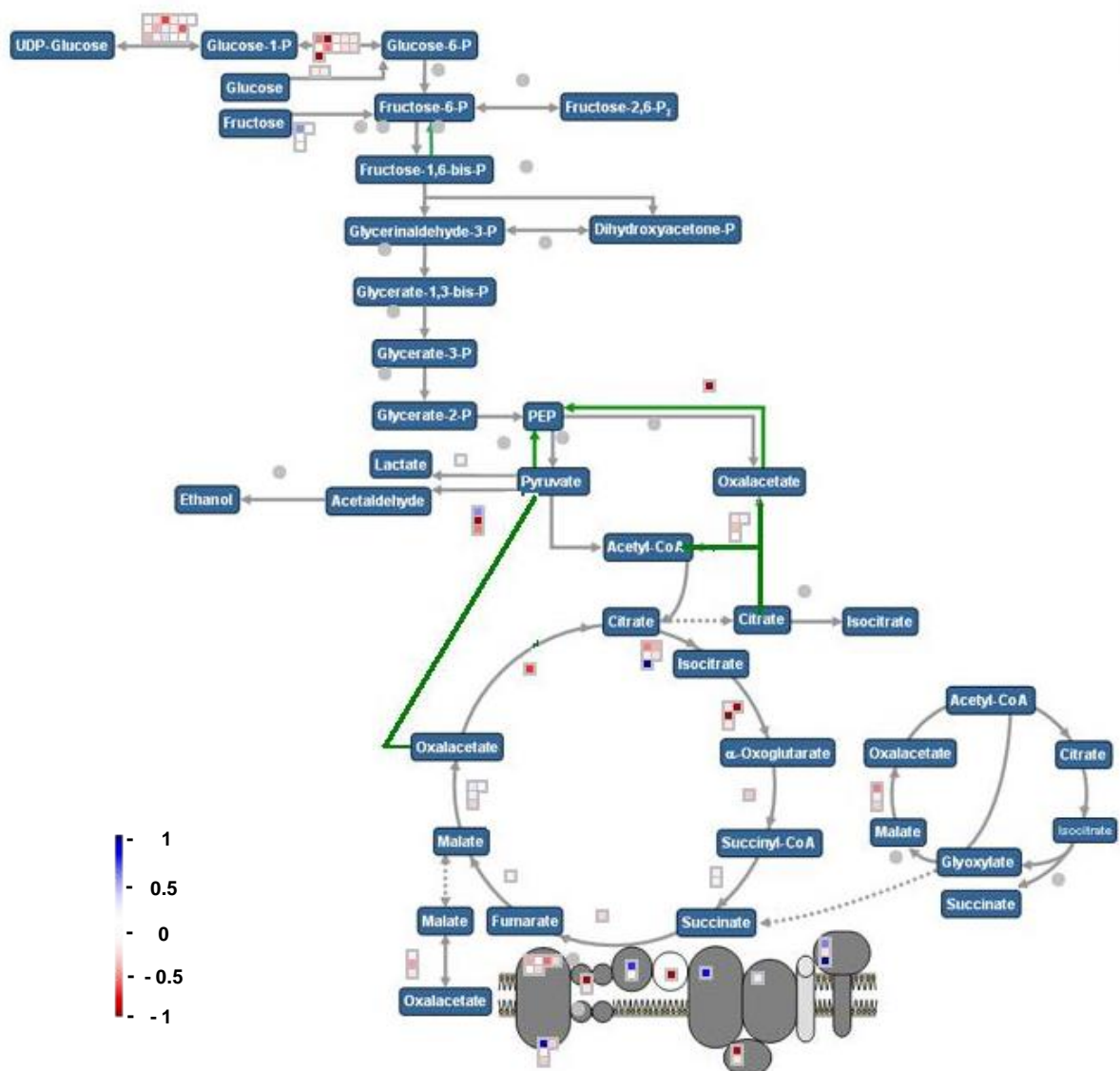
Metabolismo de Carboidratos				
Eucgr.A02923.1 PACid:23564939	7	40,2865	phosphofruktokinase 4 (PFK4)	-3,40436
Eucgr.I02501.1 PACid:23597282	7	43,0539	pyruvate kinase	-1,13985
Eucgr.I00628.1 PACid:23595173	27	258,5293	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (PCK1)	-1,07284
Eucgr.I02232.1 PACid:23596965	8	58,5166	isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1)	-1,50018
Eucgr.E01214.1 PACid:23577936	3	18,0783	alternative oxidase 1D (AOX1D)	-1,44372
Eucgr.I01564.1 PACid:23596193	8	47,0468	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A subunit 2 (GAPA-2)	-1,17677

No grupo de estresse biótico foram discutidas proteínas envolvidas em: sinalização de hormônios como IAA-leucine-resistant (ILR1)-like 3 (ILL3), ATB2, epoxy-carotenoid dioxygenase, S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases e 2OG-Fe(II)-dependent oxygenase; defesa contra ataques de patógenos (PR-proteínas) como disease-resistance-responsive dirigent-like protein e disease-resistance protein (TIR-NBS-LRR class); formação de parede celular como glucoronokinase G, caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase, actin 7, MAP215 family of microtubule-associated proteins e Tubulin binding cofactor C domain-containing protein; e regulação e sinalização celular como leucine-rich repeat transmembrane protein kinase e Protein phosphatase 2C family protein (Figura 20).

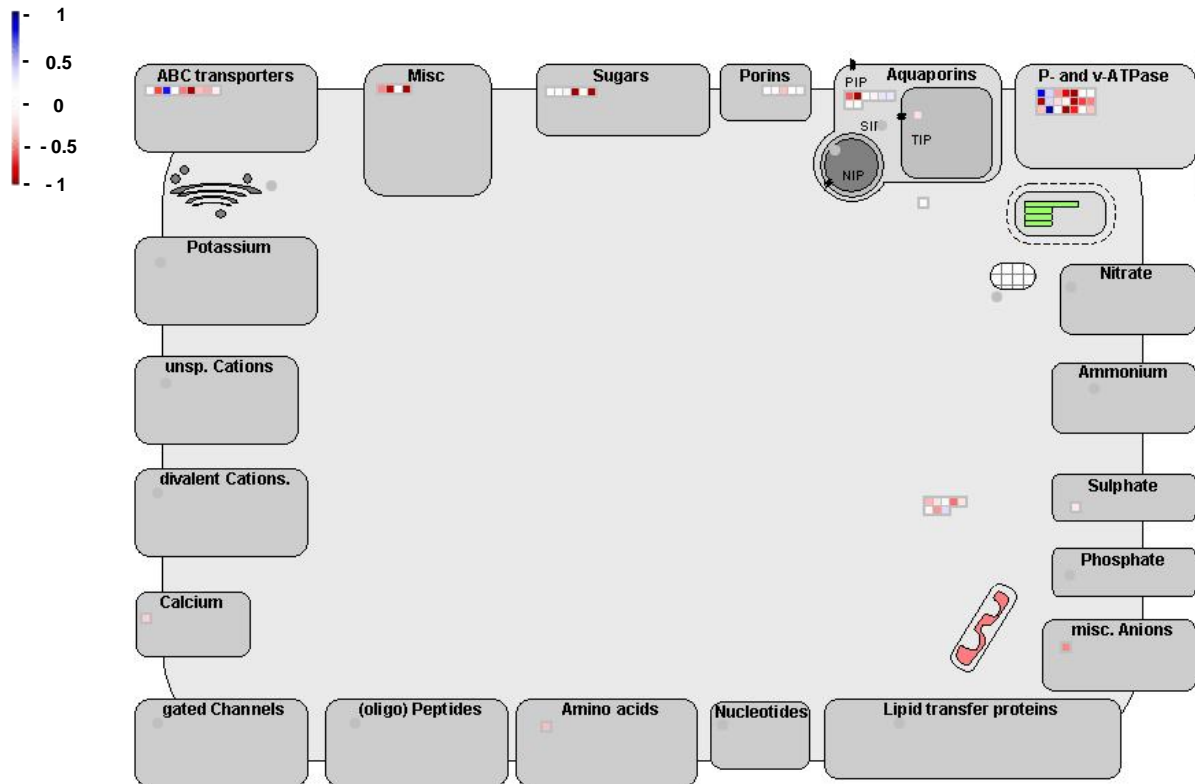
Outro grupo discutido foi o de proteínas com função de produção de energia como phosphofruktokinase 4 (PFK4), pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (PCK1), isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1), isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1), alternative oxidase 1D (AOX1D) e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (Figura 21). Por fim foram discutidas proteínas com função de transporte como TMT2, proteínas intrínsecas de membrana plasmática (PIP), H<sup>(+)</sup>-ATPase 5 (HA5) e Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein (Figura 22).



**Figura 20.** Mapeamento da regulação das proteínas envolvidas na resposta ao estresse biótico, em raízes de *Eucalyptus urograndis*, crescido por 10 dias em meio sólido contendo 0 ou 750 mg L<sup>-1</sup> de melanina. O log<sub>2</sub> do FC foi usado para determinar o nível de abundância de cada proteína. Proteínas up-reguladas (log<sub>2</sub> > 1) são indicadas em azul e proteínas down-reguladas (log<sub>2</sub> < -1) são indicadas em vermelho.



**Figura 21.** Mapeamento da regulação das proteínas do metabolismo energético, em raízes de *Eucalyptus urograndis*, crescido por 10 dias em meio sólido contendo 0 ou 750 mg L<sup>-1</sup> de melanina. O log<sub>2</sub> do FC foi usado para determinar o nível de abundância de cada proteína. Proteínas up-reguladas (log<sub>2</sub> > 1) são indicadas em azul e proteínas down-reguladas (log<sub>2</sub> < -1) são indicadas em vermelho.



**Figura 22.** Mapeamento da regulação das proteínas envolvidas em função de transporte, em raízes de *Eucalyptus urograndis*, crescendo por 10 dias em meio sólido contendo 0 ou 750 mg L<sup>-1</sup> de melanina. O log<sub>2</sub> do FC foi usado para determinar o nível de abundância de cada proteína. Proteínas up-reguladas (log<sub>2</sub> > 1) são indicadas em azul e proteínas down-reguladas (log<sub>2</sub> < -1) são indicadas em vermelho.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. A melanina exudada pelo fungo *P. tinctorius* pertence ao tipo DOPA-melanina

Embora a melanina de fungos patogênicos seja bem estudada, as melaninas dos fungos ectomicorrízicos ainda têm sido pouco exploradas, principalmente no que tange às suas propriedades químicas e funções durante as fases que precedem a interação e na sinalização da formação da simbiose ectomicorrízica. O fungo *P. tinctorius* produz melanina em meio de cultura de constituição básica para o crescimento, porém, foi observado que a disponibilidade de glicose aumenta a produção de melanina (Figura S3).

O espectro de infravermelho e a análise elementar da melanina revelaram que este pigmento pertence ao tipo DOPA-melanina, com uma alta porcentagem de nitrogênio, como já foi encontrado em outros fungos (Gonçalves et al. 2012). Casadevall et al. (2012) observaram uma diferença nas distâncias planares de empilhamento das melaninas extraídas de quatro fungos diferentes e demonstraram que é concebível que todas as melaninas compartilhem uma mesma estrutura organizacional básica, porém diferindo nas suas distâncias de empilhamento como resultado de diferenças locais na sua composição e possivelmente aos seus componentes associados. Recentemente, Chatterjee et

al. (2014) demonstraram a existência de um núcleo aromático com bases indólicas em comum entre uma melanina sintética e uma eumelanina natural isolada do fungo *Cryptococcus neoformans*. Neste contexto, a caracterização básica da melanina do *Pisolithus tinctorius* apresentada neste estudo, descreve um pigmento de constituição básica compatível com DOPA-melaninas previamente descritas, o que vem a comprovar a eficiência do processo de extração empregado para assegurar uma caracterização funcional livre de artefatos oriundos de contaminantes.

## **5.2. A morfologia das raízes de *E. urograndis* é alterada pela melanina de forma similar à induzida pela presença de fungos ectomicorrízicos**

Neste estudo, altas concentrações de melanina induziram mudanças morfológicas significativas e reduziram o crescimento das raízes de *E. urograndis*. O estabelecimento da simbiose ectomicorrízica inclui: a indução de numerosas raízes laterais pequenas e inchadas (Felten et al. 2012), raízes principais pequenas (Splivallo et al. 2009) apresentando uma zona apical reduzida e arredondada, acompanhada de uma zona meristemática pequena (Horan et al. 1988) e a inibição da morfogênese dos pelos radiculares (Ditengou et al. 2000). Acredita-se que pelo menos algumas dessas mudanças sejam induzidas por sinais liberados pelo fungo antes mesmo do contato físico entre os simbiontes (Horan e Chilvers 1990). Por exemplo, a hifaforina é um alcaloide fúngico, capaz de reduzir o alongamento dos pelos radiculares na associação *Pisolithus-Eucalyptus* (Béguiristain et al. 1995; Ditengou et al. 2003).

Tem sido sugerido que os fungos ectomicorrízicos iniciam a colonização no hospedeiro pela ponta da raiz, promovendo um inchamento dos tecidos radiculares e formando uma densa camada de hifas ao redor da região apical (Horan et al. 1988). Foi demonstrado que uma das maiores alterações na morfologia das raízes de eucalipto induzidas pela melanina foram mudanças na ponta da raiz, inibição do crescimento radicular e inibição de formação de pelos radiculares (Figuras 6, 7 e 8), o que dá suporte à hipótese da melanina fúngica poder desempenhar um papel regulatório no desenvolvimento da simbiose ectomicorrízica. Tais efeitos podem ser específicos para a melanina

ectomicorrízica, uma vez que têm sido descritos efeitos estimulatórios para outros tipos de melaninas microbianas. Gospadaryov e Lushchak (2011) também estudaram o efeito de melaninas bacterianas no crescimento de plantas e observaram que a melanina produzida pela bactéria fixadora de nitrogênio *Azotobacter chroococcum* estimulou o crescimento de plantas de alface, tomate, colza e rabanete. Os dados obtidos ainda não permitem discernir se a preponderância de efeitos inibitórios ou estimulatórios depende das diferenças estruturais entre as melaninas produzidas pelos diferentes microrganismos, ou se depende da concentração, sítio de ação e/ou estádios de desenvolvimento da planta nos quais a melanina é liberada. Todavia, é possível perceber que existe uma interessante correlação das respectivas melaninas com a indução de efeitos fisiomorfológicos compatíveis com as respostas esperadas para cada tipo de interação. Neste contexto, os nossos resultados demonstram claramente uma inibição do sistema radicular promovida pela melanina, a qual parece se relacionar perfeitamente aos eventos pré-simbióticos característicos da interação ectomicorrízica.

### **5.3. Inibição da atividade das P-H<sup>+</sup>-ATPases e do fluxo de H<sup>+</sup> pela melanina associada à inibição do sistema radicular**

A melanina exudada pelo fungo *P. tinctorius* inibiu o fluxo de H<sup>+</sup> (Figura 11A) e elevou o pH da superfície radicular (Figura 11B) na zona apical das raízes de eucalipto. A análise farmacológica mostrou que os fluxos H<sup>+</sup> detectados são mediados pela P-H<sup>+</sup>-ATPase, por sua sensibilidade ao ortovanadato. Esta proteína é extremamente importante para o crescimento radicular, como descrito na “teoria do crescimento ácido” proposta por Rayle e Cleland (1992), em que a acidificação do apoplasto regula o pH citoplasmático e a ativação de enzimas responsáveis pelo afrouxamento da parede celular (Hager 2003; Tazawa 2003). O tratamento com melanina promoveu uma inibição do fluxo de H<sup>+</sup>, tornando o pH do apoplasto mais básico, podendo representar o primeiro passo da sinalização fungo-planta (Moloney et al. 1981). Estes dados corroboram dados prévios de inibição das atividades de hidrólise e transporte de H<sup>+</sup> da P-H<sup>+</sup>-ATPases das



membranas celulares isoladas, por fracionamento celular, de raízes de plântulas expostas a esta melanina (Figura 15).

Na interação fungo-planta o citosol das células radiculares se torna ácido como uma resposta comum relacionada à defesa (Kuchitsu et al. 1997; Mathieu et al. 1996). Harmonicamente, o citosol se torna alcalino quando ocorre a troca de sinais entre fungos e plantas simbiotes (Felle et al. 1996). O aumento do pH da superfície radicular foi equivalente para as duas condições de medição do fluxo de  $H^+$ , com e sem melanina, demonstrando que a presença de melanina não afetou o pH do meio, o que poderia influenciar significativamente os padrões dos fluxos de  $H^+$  como já demonstrado em outros estudos (Scott e Allen 1999). Tem sido demonstrado que a colonização das raízes de *E. globulus* pelo fungo ectomicorrízico *P. microcarpus* estimula o efluxo de  $H^+$  na zona de alongamento da raiz, como resultado de uma indução da atividade e da expressão gênica das P- $H^+$ -ATPases (Ramos et al. 2009). No presente estudo, a inibição da atividade de bombeamento de  $H^+$  foi correlacionada com a presença de melanina. Tal dualidade de efeitos bioquímicos corrobora com a hipótese da bioatividade de melaninas poder variar com a concentração, sítio de ação e/ou estádios de desenvolvimento da planta nos quais a melanina é liberada. No caso das melaninas ectomicorrízicas, é possível que nos estágios pré-simbióticos, a melanina possa atuar como efector negativo das bombas de  $H^+$  e do crescimento radicular, e somente após o estabelecimento da simbiose, o efluxo de  $H^+$  poderia passar a ser estimulado a fim de promover o crescimento radicular e aumentar a absorção de nutrientes.

#### **5.4. Altas concentrações de melanina inibem o fluxo de $Ca^{2+}$ e reduzem o $Ca^{2+}$ extracelular resultando em alterações morfológicas na raiz**

Os íons de  $Ca^{2+}$  são provavelmente os mensageiros intracelulares mais amplamente estudados. O  $Ca^{2+}$  desempenha um papel essencial na fisiologia e bioquímica da raiz, atuando como um modulador do crescimento celular (Sanders et al. 2002). Assim como para o  $H^+$ , nós originalmente demonstramos que a melanina induz uma inibição significativa no fluxo de  $Ca^{2+}$  (Figura 13A) e uma redução na concentração de  $Ca^{2+}$  extracelular (Figura 13B) na zona apical de

plantas de eucalipto. Na associação ectomicorrízica *Pisolithus-Eucalyptus*, os efluxos de  $\text{Ca}^{2+}$  são inibidos na zona apical e as oscilações de  $\text{Ca}^{2+}$  são completamente interrompidas (Ramos et al. 2009).

Schiefelbein et al. (1992) detectaram um influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e uma corrente negativa de  $\text{Ca}^{2+}$  em pontas em crescimento de pelos radiculares de *Arabidopsis thaliana*, enquanto nenhum gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  foi registrado quando as pontas dos pelos que não estavam em crescimento foram examinadas. O gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  também está relacionado ao crescimento de tubos polínicos, pois quando a alongação celular é bloqueada, o gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  é dissipado e a corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  direcionada para a ponta é eliminada (Pierson et al. 1994; Pierson et al. 1996). Nossos resultados revelam uma correlação próxima e positiva entre os fluxos de  $\text{Ca}^{2+}$ , as correntes de  $\text{Ca}^{2+}$  e o crescimento radicular. A melanina elimina tais correntes, reduz o crescimento, e quase inibe completamente o fluxo extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Oscilações incrivelmente similares têm sido extensivamente descritas para pelos radiculares (Felle e Hepler 1997; Wymer et al. 1997), mas também já foram descritas em várias hifas fúngicas diferentes, que possuem crescimento apical (López-Franco et al. 1994).

Células da ponta da raiz de *Pisum sativum* crescidas na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  sofrem mudanças morfológicas profundas, devido à necessidade deste íon no meio externo para manter a permeabilidade seletiva da membrana celular e prevenir vazamentos (Sorokin e Sommer 1940). Na zona apical de *E. urograndis* nós também observamos uma deformação das células apicais em plantas crescidas em alta concentrações de melanina. Este pigmento possui fortes propriedades de ligação com o  $\text{Ca}^{2+}$  e age como um reservatório biológico deste íon, influenciando a regulação de múltiplos processos celulares dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  como a divisão celular e o crescimento celular polarizado (Bush e Simon 2007; Hoogduijn et al. 2003). Desta forma, é possível que altas concentrações de melanina presentes no meio de crescimento poderiam estar quelando os íons de  $\text{Ca}^{2+}$ , reduzindo sua concentração no meio e resultando em mudanças morfológicas da zona apical das raízes.

Neste trabalho, demonstramos uma função diferencial para a melanina extraída do fungo ectomicorrízico *P. tinctorius* como um sinalizador molecular no pré-estágio de desenvolvimento da simbiose. As mudanças dos fluxos de  $\text{H}^+$  na zona apical das raízes e as oscilações das diferenças de potencial registradas em

microvolts, junto com as mudanças nos fluxos de  $\text{Ca}^{2+}$  e a baixa diferença de potenciais elétricos, podem indicar que a melanina estaria agindo primeiramente na regulação dos fluxos de  $\text{H}^+$ , e conseqüentemente no pH extracelular, assim como a auxina (Felle 1988) e os ácidos húmicos (Ramos et al. 2015). Posteriormente, o gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  seria regulado e modificado (Felle 2001; Foster 1990), resultando em diversas mudanças genéticas e morfológicas, as quais são características da associação ectomicorrízica (Bonfante e Requena 2011; Chen et al. 2015).

### **5.5. A melanina do fungo *P. tinctorius* regula a expressão de proteínas envolvidas na formação da simbiose ectomicorrízica**

Fungos melanizados possuem uma ampla faixa de benefícios quando comparados com fungos que não possuem este pigmento, sendo que a maior vantagem que a melanina fornece para fungos patogênicos é o aumento da sua capacidade de virulência (Nosanchuk e Casadevall 2006; Singaravelan et al. 2008). No entanto, fungos não patogênicos também possuem melanina, incluindo aqueles que vivem em associações simbióticas com plantas, como as ectomicorrizas (Harki et al. 1997, Fernandez e Koide 2013).

A maior quantidade de proteínas regulada pela melanina está relacionada ao estresse biótico. Dentro deste grupo estão proteínas envolvidas na sinalização de hormônios, formação de parede celular, regulação e sinalização celular e defesa contra ataque de patógenos (PR-proteínas). Entre as proteínas com funções na sinalização de hormônios está IAA-leucine-resistant (ILR1)-like 3 (ILL3), que é responsável por hidrolizar conjugados de AIA, os quais possuem função no armazenamento, transporte e compartimentalização de auxinas (LeClere et al. 2002; Rampey et al. 2004). A auxina é um hormônio vegetal bem conhecido por induzir a expansão das células, especialmente células com crescimento polarizado como os pelos radiculares (Velásquez et al. 2016). Assim, a menor abundância das proteínas IAA-leucine-resistant (ILR1)-like 3 (ILL3) indica que os conjugados de AIA serão menos hidrolizados, resultando em menores quantidades de auxina livre, levando ao menor crescimento dos pelos radiculares, como observado nas raízes de *E. urograndis* crescidas na presença de melanina.

Em adição à inibição do crescimento de pelos radiculares que poderia estar sendo causada devido a menores quantidades de AIA livre, outra proteína é induzida pela auxina e pode influenciar o crescimento radicular, que é conhecida como ATB2. Esta proteína realiza o transporte de açúcares, que resulta na distribuição de carboidratos por todos os órgãos da planta (Wobbes 2004). Ela foi menos abundante nas raízes de *E. urograndis* crescidas na presença de melanina, conseqüentemente reduzindo a distribuição de carboidratos na raiz, os quais são necessários como fonte de energia para este órgão, sendo necessário para o crescimento radicular.

Além da IAA-leucine-resistant (ILR1)-like 3 (ILL3), mais três proteínas envolvidas na regulação de fitohormônios foram menos abundantes na presença de melanina. A primeira, epoxy-carotenoid dioxygenase, cataliza o primeiro passo na biosíntese de ácido abscísico (ABA), sendo que já foi demonstrado que o acúmulo de ABA promove a resistência de plantas de *Arabidopsis thaliana* à infecção do fungo necrotrófico *Alternaria brassicola* (Fan et al. 2009). A segunda, S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases, é um componente da via do ácido salicílico (AS), catalizando a metilação do AS para formar o metil salicilato (Mazarei et al. 2011), o qual já foi demonstrado como um sinal mediador móvel da resistência sistêmica requerida em plantas de tabaco (Park et al. 2007). A terceira, 2OG-Fe(II)-dependent oxygenase, participa na síntese de etileno (Zhang et al. 1997) e na ativação da via de transdução de sinal do etileno por alguns patógenos que podem induzir respostas de defesa das plantas, inclusive a via de transdução de sinal do etileno pode interagir com a via do AS para montar uma resposta de defesa efetiva contra certos patógenos (Wang et al. 2002). Já é bem conhecido que tanto microrganismos benéficos quanto parasitas ativam as respostas de defesa das plantas (Van Wees et al. 2008; Conink et al. 2015). De fato, já foi demonstrado que em plantas de arroz colonizadas com fungos micorrízicos arbusculares ou fungos patogênicos, 40 % dos genes responsivos à micorrização também foram responsivos à infecção por patógenos (Güimil et al. 2005). Portanto, o fato destas proteínas envolvidas na regulação de fitohormônios, os quais atuam na resposta de defesa da planta aos microrganismos, serem encontradas em menor abundância nas plantas crescidas em 750 mg L<sup>-1</sup> de melanina, pode estar indicando a participação deste pigmento

na inibição das respostas imunes da planta com o objetivo de facilitar a colonização pelo fungo, no estágio de pré-colonização.

Um dos mecanismos de defesa da planta ativados sob ataque de patógenos é a produção de proteínas relacionadas a patogênese, conhecidas como PR-proteínas (Sels et al. 2008). Neste trabalho foram encontradas duas PR-proteínas menos abundantes na presença da melanina: a disease-resistance-responsive dirigent-like protein, que está envolvida na formação de lignano e pode desempenhar um papel na síntese de lignina (Pickel e Schaller 2013), que fortalece a parede celular, consistindo em uma barreira estrutural contra a invasão de patógenos (Pogorelko et al. 2013); e a disease-resistance protein (TIR-NBS-LRR class), que é caracterizada pela presença de leucine-rich-repeat (LRR) motifs em sua estrutura, os quais funcionam na via de sinalização de resistência a doenças, envolvendo o gene EDS1, para fornecer resistência contra patógenos (Gassman et al. 1999). Outra proteína diretamente relacionada à defesa da planta contra patógenos, subexpressa nas raízes tratadas com melanina, é a leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, conhecida por ser um receptor extracelular que interage com ligantes de microrganismos e induz cascatas de fosforilação que levam a respostas de defesa nas plantas (Jones and Jones, 1997; Gómez-Gómez et al. 2001).

Com o intuito de evitar a infecção por patógenos, as plantas possuem receptores localizados na membrana plasmática, os quais reconhecem uma série de moléculas conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que induzem respostas imunes no vegetal, referidas como imunidade disparada por PAMPs (PTI) (Boller e Felix 2009). A produção e acúmulo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é uma resposta do tipo PTI associada a vias de imunidade intracelulares, e para regular a resistência das plantas a doenças é necessária a translocação de espécies reativas de oxigênio do apoplasto para o citoplasma, mediada por uma aquaporina da família das proteínas intrínsecas de membrana plasmática (PIP) (Tian et al. 2016). A melanina exudada pelo fungo *P. tinctorius* reduziu a abundância de um membro das PIPs nas raízes de eucalipto, o que poderia estar levando a uma redução na importação de  $H_2O_2$  do apoplasto para o citoplasma e conseqüentemente da inibição das respostas imunes da planta. As aquaporinas também realizam o transporte de  $H_2O$  e alguns solutos neutros através das membranas e, dessa forma, funcionam como osmosensores

e reguladores do volume celular em animais, plantas, fungos e bactérias. Essas proteínas possuem seus níveis de expressão aumentados em células que estão passando por mudanças de volume, o que demonstra sua importância para o crescimento celular, uma vez que a pressão osmótica, o volume da célula e a condutividade hidráulica são necessários para promover a reestruturação da forma e o crescimento da célula (Maurel et al., 2015). Assim, a subexpressão das PR-proteínas, da leucine-rich repeat transmembrane protein kinase e da plasma membrane intrinsic protein nas plantas crescidas em 750 mg L<sup>-1</sup>, servem como base para fortalecer a hipótese deste trabalho, em que a melanina exudada pelo fungo *Pisolithus tinctorius* estaria atuando como uma molécula sinalizadora no estágio de pré-colonização da raiz pelo fungo, inibindo a resposta imune do vegetal, facilitando a formação da simbiose ectomicorrízica.

Algumas proteínas envolvidas com a formação de parede celular tiveram seus níveis reduzidos na presença de melanina. A caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase, está envolvida na biossíntese de lignina, um componente da parede celular secundária. Este componente é característico de plantas mais desenvolvidas, uma vez que este tipo de parede só se forma após ter cessado o crescimento celular, e pode funcionar como uma barreira física na resposta a ataques de microrganismos (Zubieta et al., 2002). A parede celular dos vegetais é composta por uma rede de diferentes polímeros de carboidratos e glicoproteínas. A enzima glucoronokinase atua na conversão do ácido glucorônico em ácido glucorônico-1P, o qual é convertido em UDP-glucuronic acid que fornece cerca de 50 % da biomassa da parede celular e representa um metabólito chave na via de interconversão dos nucleotídeos de açúcar (Pieslinger et al. 2010). O citoesqueleto é de extrema importância para manter a forma e apoio da célula e fornecer movimentos celulares. As proteínas actin 7, tubulin binding cofactor C domain-containing protein e MAP215 family of microtubule-associated proteins, atuam na formação e regulação do citoesqueleto vegetal (Hussey et al. 2006; André et al. 2013; Kawamura e Wasteneys 2008), que é um componente necessário para manter a organização e forma da célula, e para fornecer um meio de movimentação para os componentes, facilitando as reações (Verchot-Lubicz e Goldstein, 2010). Torna-se claro que vários fatores conhecidos por desempenharem um importante papel na morfologia celular tiveram seus níveis de expressão modificados pela melanina exudada pelo fungo *P. tinctorius*, o que

condiz com as modificações morfológicas das raízes de *E. urograndis* crescidas em altas concentrações de melanina observadas neste trabalho (Figuras 7 e 8), as quais já foram observadas durante a formação da simbiose ectomicorrízica (Ling-Lee et al. 1977).

Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é uma enzima conhecida pelo seu papel na glicólise, em que ela cataliza a reação reversível de conversão do gliceraldeído 3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato (Zaffagnini et al. 2007). No entanto, tem sido recentemente demonstrado em raízes de *Arabidopsis thaliana*, que a atividade de expressão desta enzima nas pontas das raízes, é necessária para o crescimento primário da raiz (Anoman et al. 2016), sendo consistente com os resultados encontrados neste trabalho, em que a melanina promoveu uma inibição do crescimento radicular, podendo estar pelo menos parcialmente relacionado também a esta menor abundância de GAPDH nas plantas crescidas em alta concentração deste pigmento.

A melanina também reduziu a abundância de outras proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos para a célula, tais como: phosphofructokinase 4 (PFK4) e pyruvate kinase que catalizam a terceira e a décima reação da glicólise; phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (PCK1) que cataliza um passo limitante da produção de glicose na via da gliconeogênese; a isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) que desempenha um papel essencial na função oxidativa do ciclo do ácido cítrico; e a NAD(P)H dehydrogenase B2 (NDB2) e a alternative oxidase 1D (AOX1D) que participam nas reações redox da cadeia transportadora de elétrons, que é o passo final da produção de ATP na célula (Plaxton, 1996; Givan 1999). Além disso, houve uma menor abundância da proteína TMT2 nas plantas de *E. urograndis* crescidas na melanina, que poderia contribuir para o aumento de sacarose no citosol, uma vez que esta proteína é um antiporter acoplado a próton com função de transportar sacarose para o interior do vacúolo, o qual funciona como um compartimento dreno para acúmulo de íons, açúcares e diversos outros metabólitos (Schulz et al. 2011). Tais proteínas estão envolvidas na produção de energia para a célula na forma de ATP, o qual é utilizado pelas bombas de H<sup>+</sup> como substrato para realizar o transporte de H<sup>+</sup> e gerar a energia necessária para a absorção de íons e para o crescimento celular. Logo, a menor abundância destas proteínas nas plantas de *E. urograndis* crescidas em 750 mg L<sup>-1</sup> de melanina, encontra-se de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, em

que foi observado um menor crescimento radicular nas plantas crescidas em altas concentrações de melanina (Figura 6).

Foi observada neste trabalho uma alcalinização, in vivo, do pH da superfície da zona apical das raízes de *E. urograndis* crescidas em altas concentrações de melanina, e isto está de acordo com a inibição do fluxo de  $H^+$  in vivo (Figuras 11 e 14), a menor atividade hidrolítica do ATP e menor atividade de bombeamento das P- $H^+$ -ATPases observadas in vitro nas frações microsossomais (Figura 15). Além disso, a análise proteômica mostra que a  $H^+$ -ATPase 5 (HA5) foi menos abundante nas plantas tratadas com melanina. Tem sido proposto o envolvimento da P- $H^+$ -ATPase em diversas funções fisiológicas e dentre elas está a expansão celular, descrita na “teoria do crescimento ácido”, em que ocorre a ativação das P- $H^+$ -ATPases, pela auxina, resultando em acidificação do apoplasto que leva a maior atividade de enzimas, como expansinas, as quais catalisam a quebra de ligações celulose-hemicelulose plasticizando a parede celular (Hager, 2003). Inclusive, três expansinas foram identificadas nas raízes de *E. urograndis*, porém sua expressão não foi alterada na presença da melanina em relação ao tratamento  $0 \text{ mg L}^{-1}$  de melanina (dados não mostrados), o que demonstra que de fato sua atividade é regulada pós-transcricionalmente pela alteração na acidificação do apoplasto e não em nível de expressão gênica.

Recentemente, foi demonstrada uma ativação da P- $H^+$ -ATPase através da fosforilação da penúltima treonina em hipocótilos etiolados de *Arabidopsis thaliana* na presença de auxina, sendo que este aumento na atividade estaria ocorrendo sem mudanças na quantidade da enzima (Takahashi et al., 2012). Plantas de *Arabidopsis thaliana* superexpressando a proteína SAUR19 (Subfamília da Small Auxin Up RNA) exibiram um aumento na atividade da P- $H^+$ -ATPase e no crescimento. Os autores demonstraram que a SAUR19 estimula a atividade de bombeamento de  $H^+$  através da promoção da fosforilação do domínio autoinibitório C-terminal. Além disso, eles relataram que as proteínas SAUR interagem com a proteína PP2C-D, uma subfamília do tipo 2C de fosfatases. Essas fosfatases interagem fisicamente com as P- $H^+$ -ATPases, regulando negativamente a sua atividade através da desfosforilação da treonina, e são inibidas pelas SAUR, tornando as P- $H^+$ -ATPases ativas e promovendo a expansão celular (Spartz et al., 2014). No presente trabalho, a proteína PP2C (proteína fosfatase 2C) foi encontrada em maior abundância nas plantas tratadas



com melanina, sugerindo uma ativação dessas proteínas pela melanina, que estariam promovendo a inibição das P-H<sup>+</sup>-ATPases e, conseqüentemente, a redução do crescimento radicular.

As V-H<sup>+</sup>-ATPases são bombas de H<sup>+</sup> localizadas nas membranas do vacúolo e são formadas por uma parte catalítica hidrofílica (V<sub>1</sub>) e uma parte membranar hidrofóbica (V<sub>0</sub>), compostas por diferentes subunidades. A subunidade C é responsável por manter as unidades catalítica e membranar desta enzima unidas (Nishi e Forgac, 2002). Schumacher et al. (1999), demonstraram que mutantes de *Arabidopsis* defectivas no gene *det3*, o qual codifica a subunidade C da V-H<sup>+</sup>-ATPase, possuem reduzida expansão celular e morfogênese que podem ser causadas por uma menor absorção de solutos ou por um reduzido fluxo membranar, resultado da menor atividade da V-H<sup>+</sup>-ATPase. Embora tenha ocorrido uma maior abundância da subunit C of the vacuolar H(+)-ATPase (V-ATPase) nas raízes de *E. urograndis* crescidas com melanina e tenha ocorrido uma inibição do crescimento radicular, pode-se hipotetizar que poderia estar em ação um mecanismo de neutralização, pois devido à reduzida atividade das P-H<sup>+</sup>-ATPases, a quantidade de H<sup>+</sup> no citosol estaria em excesso, assim, o acoplamento das V-H<sup>+</sup>-ATPases estaria sendo induzido a fim de transportar os H<sup>+</sup> em excesso para o vacúolo e manter a homeostase celular.

Phosphatidylinositol transfers proteins regulam a interface de sinalização entre o metabolismo de lipídios e o transporte entre a membrana. Vincent et al. (2005) descrevem uma nova família de proteínas Sec14p-nodulin domain, as quais compartilham propriedades funcionais consistentes com as Sec14p-like Phosphatidylinositol transfers proteins. Os autores também relatam uma função biológica para esta proteína, uma vez que a perda do gene que codifica esta proteína compromete drasticamente o crescimento polarizado dos pelos radiculares, através da redução do gradiente de phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (um conhecido regulador do transporte membranar polarizado), dispersão de vesículas secretórias no citoplasma, perda da rede de f-actina, desorganização do microtúbulo do citoesqueleto e desregulação do gradiente de Ca<sup>2+</sup> no pelo radicular. Estes resultados vão de acordo com a menor abundância das Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein registrada nas plantas de *E. urograndis* crescidas em 750 mg L<sup>-1</sup> de melanina, as quais apresentaram inibição da produção de pelos radiculares (Figura 8).

## 6. RESUMO E CONCLUSÕES

Altas concentrações de melanina inibiram os fluxos de  $H^+$  e  $Ca^{2+}$  na zona apical das raízes de *E. urograndis*. O crescimento das raízes de eucalipto foi inibido com o aumento da concentração de melanina no meio e a zona apical da raiz apresentou alterações na morfologia. Além disso, não houve crescimento de pelos radiculares e as raízes laterais encontraram-se menos desenvolvidas nas plantas tratadas com altas concentrações de melanina. A melanina também regulou a expressão de proteínas envolvidas com a inativação dos sistemas de defesa da planta, redução do metabolismo de carboidratos e alteração da morfologia da célula.

Em conjunto, os resultados obtidos revelam um novo papel para melaninas fúngicas, no qual estes pigmentos passam a integrar o sistema sinalizador responsável por modular fisiomorfologicamente o organismo hospedeiro. No caso específico das ectomicorrizas, a melanina fúngica modula processos pré-simbióticos na raiz da planta simbiote desativando seu sistema de defesa e seu programa de desenvolvimento radicular, principalmente no que tange às estruturas absorptivas. Tais evidências revelam um novo papel para a melanina na simbiose ectomicorrízica, em que este pigmento estaria atuando como uma molécula sinalizadora, capaz de alterar processos eletrofisiológicos e bioquímicos, resultando em alterações morfológicas necessárias para a formação desta

simbiose. A contínua anotação dos genomas de novos fungos, plantas e animais, e a conjugação de técnicas moleculares e biofísicas para análises cada vez mais refinadas de expressões gênica e funcionais devem expandir este novo conceito acerca dos fenômenos de sinalização mediados por melaninas, ampliando sua abrangência aos mais diferentes tipos de interações envolvendo organismos melanogênicos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 sobre o crescimento de *Eucalyptus dunnii* Maiden. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36:307-313.

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

Ambrico, M., 2016. Special issue: melanin, a long lasting history bridging natural pigments and organic bioelectronics. *Polym. Int.* 65, 1249e1250.

André, J., Harrison, S., Towers, K., Qi, X., Vaughan, S., McKean, P.G., Ginger, M.J. (2013) Tubulin-Binding cofactor C domain-containing protein TBCCD1 orchestrates cytoskeletal filament formation. *Journal of Cell Science*, doi: 10.1242/jcs.136515.

Anoman, A.D., Flores-Tornero, M., Rosa-Telléz, S., Munoz-Bertomeu, J., Segura, J., Ros, R. (2016) The specific role of plastidial glycolysis in photosynthetic and heterotrophic cells under scrutiny through the study of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Plant Signaling & Behavior*, 11:e1128614 (3 pages).

Augé, R.M. (2001) Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*, 11:3-42.

- Baptista, P., Tavares, R.M., Lino-Neto, T. (2011) Signaling in Ectomycorrhizal Symbiosis Establishment. In: (eds.) *Diversity and Biotechnology of Ectomycorrhizae*. ed. Springer, p. 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.
- Béguiristain, T., Cote, R., Rubini, P., Jay-Allemand, C., Lapeyrie, F. (1995) Hypaphorine accumulation in hyphae of the ectomycorrhizal fungus, *Pisolithus tinctorius*. *Phytochemistry*, 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*, 22:787-799.
- Bell, A.A., Wheeler, M.H. (1986) Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annuals Reviews of Phytopathology*, 24:411-451.
- Boller, T., Felix, G. (2009) A Renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60:379-406.
- Bonfante, P., Requena, N. (2011) Dating in the dark: how roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 14:451-457.
- 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 protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.
- Bryan, R., Jiang, Z., Friedman, M., Dadachova, E. (2011) The effects of gamma radiation, UV and visible light on ATP levels in yeast cells depend on cellular melanization. *Fungal Biology*, 115:945-949.
- Bublitz, M., Morth, J.P., Nissen, P. (2012) P-type ATPases at a glance. *Journal of Cell Science*, 124:2515-2519.
- Bücking, H., Heyser, W. (2001) Microautoradiographic localization of phosphate and carbohydrates in mycorrhizal roots of *Populus tremula* × *Populus alba* and the implications for transfer processes in ectomycorrhizal associations. *Tree Physiology*, 21:101-107.

Bush, W.D., Simon, J.D. (2007) Quantification of Ca<sup>2+</sup> binding to melanin supports the hypothesis that melanosomes serve a functional role in regulating calcium homeostasis. *Pigment Cell Research*, 20:134-139.

Butler, M.J., Day, A.W. (1998) Fungal melanins: A review. *Canadian Journal of Microbiology*, 44:1115–1136.

Canellas, L.P., Olivares, F.L., Okorokova-Façanha, A.L., Façanha, A.R. (2002) Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiology*, 130:1951-1957.

Canellas, L.P., Teixeira Junior, 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.

Casadevall, A., Nakouzi, A., Crippa, P.R., Eisner, M. (2012) Fungal melanins differ in planar stacking distances. *PLoS One*, 7.

Chai, L.Y.A., Netea, M.G., Sugui, J., Vonk, A.G., Van De Sande, W.W.J., Warris, A., Kwon-Chung, K.J., Jan Kullberg, B. (2010) *Aspergillus fumigatus* conidial melanin modulates host cytokine response. *Immunobiology*, 215:915-920.

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., Tan, S., Itin, B., Casadevall, A., Stark, R.E. (2014) Demonstration of a common indole-based aromatic core in natural and synthetic eumelanins by solid-state NMR. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 12:6730-6736.

Chen, J., Gutjahr, C., Bleckmann, A., Dresselhaus, T. (2015) Calcium signaling during reproduction and biotrophic fungal interactions in plants. *Molecular Plant*, 8:595-611.

Chen, J., Wang, C., Shu, C., Zhu, M., Zhou, E. (2015) Isolation and characterization of a melanin from *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight. *European Journal of Plant Pathology*, 142:281–90.

Coelho, R.R.R., Sacramento, D.R., Linhares, L.F. (1997) Amino sugars in fungal melanins and soil humic acid. *European Journal of Soil Science*, 48:425-429.

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

Coninck, B., Timmermans, P., Vos, C., Cammue, B.P.A., Kazan, K. (2015) What lies beneath: belowground defense strategies in plants. *Trends in Plant Science*, 20:91-101.

Cordero, R.J.B., Casadevall, A. (2017) Functions of fungal melanin beyond virulence. *fungal biology reviews*, <http://dx.doi.org/sci-hub.cc/10.1016/j.fbr.2016.12.003>.

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

Cunha, M.M.L., Franzen, A.J., Seabra, S.H., Herbst, M.H., Vugman, N.V., Borba, L.P., De Souza, W., Rozental, S. (2010) Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals. *BMC Microbiology*, 10:80.

Dadachova, E., Casadevall, A. (2008) Ionizing radiation: how fungi cope, adapt, and exploit with the help of melanin. *Current Opinion in Microbiology*, 11:525-531.

Damerval, C., De Vienne D., Zivy M., Thiellement H. (1986) Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*, 7:52-54.

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.

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

d'Ischia, M., Wakamatsu, K., Napolitano, A., Briganti, S., Garcia-Borron, J.-C., Kovacs, D., Meredith, P., Pezzella, A., Picardo, M., Sarna, T., Simon, J.D., Ito, S. (2013) Melanins and melanogenesis: methods, standards, protocols. *Pigment Cell Melanoma Res.*, 26:616–633.

Ditengou, F.A., Lapeyrie, F. (2000) Hypaphorine from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* counteracts activities of indole-3-acetic acid and ethylene but not synthetic auxins in eucalypt seedlings. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13:151-158.

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., 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., Polle, 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. *menziesii* and var. *glauca*) in response to manganese stress. *Mycorrhiza*, 18:227-239.

Eisenman, H.C., Casadevall, A. (2012) Synthesis and assembly of fungal melanin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93: 931-940.

Façanha, A.R., De Meis, L. (1998) Reversibility of H<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-pyrophosphatase in tonoplast vesicles from maize coleoptiles and seeds. *Plant physiology*, 116:1487-1495.

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. (2002) Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37:1301-1310.

Fan, J., Hill, L., Crooks, C., Doerner, P., Lamb, C. (2009) Abscisic acid has a key role in modulating diverse plant-pathogen interactions. *Plant Physiology*, 150:1750-1761.

Farbiarz, S.R., De Carvalho, T.U., Alviano, C., De Souza, W. (1992) Inhibitory effect of melanin on the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with mammalian cells in vitro. *Medical Mycology*, 30:265-273.

Feijó, J.A., Sainhas, J., Hackett, G.R., Kunkel, J.G., Hepler, P.K. (1999) Growing pollen tubes possess a constitutive alkaline band in the clear zone and a growth-dependent acidic tip. *The Journal of Cell Biology*, 144:483-496.

Felle, H. (1988) Auxin causes oscillations of cytosolic free calcium and pH in *Zea mays* coleoptiles. *Planta*, 174:495-499.

Felle, H.H. (2001) pH: signal and messenger in plant cells. *Plant Biology*, 3:577-591.

Felle, H.H., Hepler, P.K. (1997) The cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration gradient of *Sinapis alba* root hairs as revealed by Ca<sup>2+</sup>-selective microelectrode tests and fura-dextran ratio imaging. *Plant Physiology*, 114:39-45.

Felle, H.H., Kondorosi, E., Kondorosi, A., Schultze, M. (1996) Rapid alkalinization in alfalfa root hairs in response to rhizobial lipochitooligosaccharide signals. *The Plant Journal*, 10:295-301.

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*: is fungal auxin the trigger. *Plant Signaling & Behavior*, 5:864-867.

Felten, J., Martin, F., Legué, V. (2012) Signalling in ectomycorrhizal symbiosis. In: *Signaling and Communication in Plant Symbiosis*. Springer, pp 123-142.



- Fernandez, C.W., Koide, R.T. (2013) The function of melanin in the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum* under water stress. *Fungal Ecology*, 6:479-486.
- Ferrol, N., Pozo, M.J., Antelo, M., Azcón-Aguilar, C. (2002) Arbuscular mycorrhizal symbioses regulate plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene expression in tomato plants. *Journal of Experimental Botany*, 374:1683-1687.
- Fiske, C.H., Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *The Journal of Biological Chemistry*, 66:375-400.
- Fogarty, R.V., Tobin, J.M. (1996) Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzyme and Microbial Technology*, 19:311-317.
- Foster, J.R. (1990) Influence of pH and plant nutrient status on ion fluxes between tomato plants and simulated acid mists. *New Phytologist*, 116:475-485.
- 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., Pérez-Castiñera, J.R., Navarro-Aviñó, J.P., Culiñez-Maciá, F.A., Kuppinger, O., Stransky, H., Pagés, M., Hager, A., Serrano, R. (1996) A major isoform of the maize plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: characterization and induction by auxin in coleoptiles. *The Plant Cell*, 8:1533-1544.
- Friedmann, E.I., McKay, C.P., Nienow, J.A. (1987) The cryptoendolithic microbial environment in the Ross Desert of Antarctica: satellite-transmitted continuous nano-climate data. *Polar Biology*, 7:273-287.
- Fries, N., Serck-Hanssen, K., Dimberg, L.H., Theander, O. (1987) Abietic acid, and activator of basidiospore germination in ectomycorrhizal species of the genus *Suillus* (Boletaceae). *Experimental Mycology*, 11:360-363.
- Fuglsang, A.T., Visconti, S., Drumm, K., Jahn, T., Stensballe, A., Mattei, B., Jensen, O.N., Aducci, P., Palmgren, M.G. (1999) Binding of 14-3-3 protein to the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase AHA2 involves the three C-terminal residues Tyr946-Thr-Val and requires phosphorylation of Thr947. *J Biol Chem* 274(51): 36774-36780.
- Fukaki, H., Tasaka, M. (2009) Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Molecular Biology*, 69:437-449.

- Garcia, K., Delaux, P-M., Cope, K.R., Ané, J-M. (2015) Molecular signals required for the establishment and maintenance of ectomycorrhizal symbiosis. *New phytologist*, 208:79-87.
- Gassmann, W., Hinsch, M.E., Staskawicz, B.J. (1999) The Arabidopsis RPS4 bacterial-resistance gene is a member of the TIR-NBS-LRR Family of disease-resistance genes. *The Plant Journal*, 20:265-277.
- Gaxiola, R.A., Palmgren, M.G., Schumacher, K. (2007). Plant proton pumps. *Febs Letters*, 581(12):2204-2214.
- Gianinazzi-Pearson, V., Arnould, C., Oufattole, M., Arango, M., Gianinazzi, S. (2000) Differential activation of H<sup>+</sup>-ATPase genes by an arbuscular mycorrhizal fungus in root cells of transgenic tobacco. *Planta*, 21:609-613.
- Giannini, J.L., Briskin, D.P. (1987) Proton transport in plasma membrane and tonoplast vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue a comparative study of ion effects on  $\Delta\text{pH}$  and  $\Delta\Psi$ . *Plant physiology*, 84:613-618.
- Givan, C. (1999) Evolving concepts in plant glycolysis: two centuries of progress. *Biol. Rev.* 74: 277-309.
- Gómez-Gómez, L., Bauer, Z., Boller, T. (2001) Both the extracellular Leucine-Rich Repeat Domain and the Kinase Activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 13:1155–1163.
- Gonçalves, R.C., Kitagawa, R.R., Raddi, M.S., Carlos, I.Z., Pombeiro-Sponchiado, S.R. (2013) Inhibition of nitric oxide and tumour necrosis factor- $\alpha$  production in peritoneal macrophages by *Aspergillus nidulans* melanin. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 36:1915-1920.
- Gonçalves, R.C.R., Lisboa, H.C.F., Pombeiro-Sponchiado, S.R. (2012) Characterization of melanin pigment produced by *Aspergillus nidulans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28:1467-1474.
- Gonçalves, R.C.R., Pombeiro-Sponchiado, S.R. (2005) Antioxidant activity of the melanin pigment extracted from *Aspergillus nidulans*. *Notes*, 28:1129-1131.
- Gorbushina, A.A. (2007) Life on the rocks. *Environmental Microbiology*, 9:1613-1631.
- Gospadaryov, D., Lushchak, V. (2011) Some properties of melanin produced by *Azobacter 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 Ciência do Solo*, 25:839-848.

Grishkan, I., Nevo, E. (2010) Spatiotemporal distribution of soil microfungi in the Makhtesh Ramon area, central Negev desert, Israel. *Fungal Ecology*, 3:326-337.

Güimil, S., Chang, H-S., Zhu, T., Sema, A., Osbourne, A., Roux, C., et al. (2005) Comparative transcriptomics of rice reveals an ancient pattern of response to microbial colonization. *PNAS*, 102:8066-8070.

Hager, A. (2003) Role of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *Journal of Plant Research*, 116:483-505.

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

Hager, A., Menzel, H., Krauss, A. (1971) Versuche und hypothese zur primärwirkung des auxins beim streckungswachstum. *Planta*, 100:47-75.

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

Harki, E., Talou, T., Dargent, R. (1997) Purification, characterisation and analysis of melanin extracted from *Tuber melanosporum* Vitt. *Food Chemistry*, 58:69-73.

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.

Hayes, M.H., Malcolm, R. (2001) Consideration of composition and aspects of the structures of humic substances. In: Hayes, M.H, Malcolm, R. (eds.) *Humic substances and chemical contaminants*. Madson: Soil Science Society of America, p. 3-39.

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.

Hignett, R.C., Roberts, A.L., Carder, J.H. (1979) The properties of extracellular enzymes of *Venturia inaequalis* and their association with loss of virulence of the fungus in culture. *Journal of General Microbiology*, 110:67-75.

Hoogduijn, M.J., Smit, N.P., Van Der Laarse, A., Van Nieuwpoort, A.F., Wood, J.M., Thody, A.J. (2003) Melanin has a role in Ca<sup>2+</sup> homeostasis in human melanocytes. *Pigment Cell Research*, 16:127-132.

Horan, D.P., Chilvers, G.A. (1990) Chemotropism—the key to ectomycorrhizal formation? *New Phytologist*, 116:297-301.

Horan, D.P., Chilvers, G.A., Lapeyrie, F.F. (1988) Time sequence of the infection process eucalypt ectomycorrhizas. *New Phytologist*, 109:451-458.

Horbach, R., Ludwig, N., Loehrer, M., Hempel, M., Mathea, S., Schliebner, I., Menzel, M., Kiesow, A., Schaffrath, U., Deising, H.B. (2013) Melanin is not required for turgor generation but enhances cell wall rigidity in appressoria of the corn pathogen *Colletotrichum graminicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27:315-327.

Howard, R.J., Ferrari, M.A. (1989) Role of melanin in appressorium function. *Experimental Mycology*, 13:403-418.

Howard, R.J., Valent, B. (1996) Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annual Reviews in Microbiology*, 50:491-512.

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*. *The Journal of Immunology*, 155:3507-3516.

Hussey, P., Ketelaar, T., Deeks, M.J. (2006) Control of the actin cytoskeleton in plant cell growth. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:109–25.

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.

Jacobson, E.S., Hove, E., Emery, H.S. (1995) Antioxidant function of melanin in black fungi. *Infection and Immunity*, 63:4944-4945.

Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H.J., Pellon, G. (1998) *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol. Res.*, 102:1459-1483.

Jones, D.A., Jones, J.D.G. (1997) The role of Leucine-Rich Repeat Proteins in plant defences. *Advances in Botanical Research*, 24:89–167.

Jalmi, P., Bodke, P., Wahidullah, S., Raghukumar, S. (2012) The fungus *Gliocephalotrichum simplex* as a source of abundant, extracellular melanin for biotechnological applications. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 28:505-512.

Kanczewska, J., Marco, S., Vandermeeren, C., Maudoux, O., Rigaud, J., Boutry, M. (2005) Activation of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by phosphorylation and binding of 14-3-3 proteins convert a dimer into a hexamer. *PNAS*, 102(33):11675-11680.

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.

Kasai, M., Nakamura, T., Kudo, M., Sato, H., Maeshima, M., Sawada, S. (1998) The activity of the root vacuolar H<sup>+</sup>-Pyrophosphatase in rye plants grown under conditions deficient in mineral nutrients. *Plant & Cell Physiology*, 39:890-894.

Kawamura, C., Tsujimoto, T., Tsuge, T., 1999. Targeted disruption of a melanin biosynthesis gene affects conidial development and UV tolerance in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12, 59e63.

Kawamura, E., Wasteneys, G.O. (2008) MOR1, the *Arabidopsis thaliana* homologue of *Xenopus* MAP215, promotes rapid growth and shrinkage, and suppresses the pausing of microtubules in vivo. *Journal of Cell Science*, 121:4114-4123.

Kejzar, A., Gobec, S., Plemenitas, A., Lenassi, M. (2013) Melanin is crucial for growth of the black yeast *Hortaea werneckii* in its natural hypersaline environment. *Fungal Biology*, 117:368-379.

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

Krajinsky, F., Courty, P.E., Sieh, D., Franken, P. et al. (2014) The H<sup>+</sup>-ATPase HA1 of *Medicago truncatula* Is Essential for Phosphate Transport and Plant Growth during Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *The Plant Cell*, 26:1808–1817.

Krajinski, F., Hause, B., Gianinazzi-Pearson, V., and Franken, P. (2002). Mth1, a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene from *Medicago truncatula*, shows arbuscule-specific induced expression in mycorrhizal roots. *Plant Biol.* 4:754–761.

Krügner, T.L., Filho, M.T. (1979) Tecnologia de inoculação micorrízica em viveiro de *Pinus* spp. *Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais*, 71:1-5.

Kubo, Y., Nakamura, H., Kobayashi, K., Okuno, T., Furusawa, I. (1991) Cloning of a melanin biosynthetic gene essential for appressorial penetration of *Colletotrichum lagenarium*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 4:440-445.

Kuchitsu, K., Yazaki, Y., Sakano, K., Shibuya, N. (1997) Transient cytoplasmic pH change and ion fluxes through the plasma membrane in suspension-cultured rice cells triggered by N-acetylchitoooligosaccharide elicitor. *Plant and Cell Physiology*, 38:1012-1018.

Kulikova, N.A., Stepanova, E.V., Koroleva, O.V. (2005) Mitigating Activity of Humic Substances: Direct Influence on Biota. *In: Perminova, I.V., Hatfield, K., Hertkorn, N. (eds.) Use of Humic Substances to Remediate Polluted Environments: From Theory to Practice.* Netherlands: Springer Netherlands, p. 285-309.

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., Van Breemen, N. (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.

Lee, J-K., Jung, H-M., Kim, S-Y. (2003) 1,8-Dihydroxynaphthalene (DHN)-Melanin biosynthesis inhibitors increase erythritol production in *Torula corallina*, and DHN-melanin inhibits erythrose reductase. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:3427-3434.

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.

LeClere, S., Telle, R., Rampey, R.A., Matsuda, S.P.T., Bartel, B. (2002) Characterization of a family of *iaa*-amino acid conjugate hydrolases from *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 23:20446-20452.

Lei, J., Dexheimer, J. (1988) Ultrastructural localization of ATPase activity in the *Pinus sylvestris*/Laccaria laccata ectomycorrhizal association. *New Phytol.* 108:329–334.

Liu, D., Wei, L., Guo, T., Tan, W. (2014) Detection of DOPA-Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Penicillium marneffeii* and its effect on macrophage phagocytosis in vitro. *PloS one*, 9:1-7.

Liu, T., Xu, S., Liu, L., Zhou, F., Hou, J., Chen, J. (2011) Cloning and characteristics of Brn1 gene in *Curvularia lunata* causing leaf spot in maize. *European Journal of Plant Pathology*, 131:211-219.

López-Franco, R., Bartnicki-Garcia, S., Bracker, C.E. (1994) Pulsed growth of fungal hyphal tips. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91:12228-12232.

Luo, Z.-B., Wu, C., Zhang, C., Li, H., Lipka, U., Polle, A. (2013) The role of ectomycorrhizas in heavy metal stress tolerance of host plants. *Environmental and Experimental Botany*, 1-16.

- Maeshima, M. (2000) Vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1465:37-51.
- 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.
- Marschner, H., Dell, B. (1994) Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil*, 159:89-102.
- 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.
- 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.
- Mathieu, Y., Lapous, D., Thomine, S., Laurière, C., Guern, J. (1996) Cytoplasmic acidification as an early phosphorylation-dependent response of tobacco cells to elicitors. *Planta*, 199:416-424.
- Maurel, C., Boursiac, Y., Luu, D-T., Santoni, V., Shahzad, Z., Verdoucq, L. (2015) Aquaporins in plants. *Physiol Rev* 95:1321–1358.
- Mazarei, M., Liu, W., Al-Ahmad, H., Arelli, P., Pantalone, V.R. and Stewart, C.N. Jr. (2011) Gene expression profiling of resistant and susceptible soybean lines infected with soybean cyst nematode. *Theor. Appl. Genet.* 123, 1193–1206.
- Mcqueen-Mason, S., Durachko, D.M., Cosgrove, D.J. (1992) Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *The Plant Cell Online*, 4:1425-1433.
- Mendgen, K., Deising, H. (1993) Infection structures of fungal plant pathogens—a cytological and physiological evaluation. *New Phytologist*, 124:193-213.
- Merlot, S., Leonhardt, N., Fenzi, F., Valon, C., Costa, M., Piette, L., Vavasseur, A., Genty, B., Boivin, K., Müller, A., Giraudat, J., and Leung, J. (2007). Constitutive activation of a plasma membrane H(+)-ATPase prevents abscisic acid-mediated stomatal closure. *EMBO J.* 26:3216–3226.
- Moloney, M.M., Elliott, M.C., Cleland, R.E. (1981) Acid growth effects in maize roots: evidence for a link between auxin-economy and proton extrusion in the control of root growth. *Planta*, 152:285-291.
- Money, N.P., Caesar-Tonthat, T.-C., Frederick, B., Henson, J.M. (1998) Melanin synthesis is associated with changes in hyphopodial turgor, permeability, and wall rigidity in *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis*. *Fungal Genetics and Biology*, 24:240-251.

- Morano, K.A., Klionsky, D.J. (1994) Differential effects of compartment deacidification on the targeting of membrane and soluble proteins to the vacuole in yeast. *Journal of Cell Science*, 107:2813-2824.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vianello, A. (2002) Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 34:1527-1536.
- Nebbioso, A., Piccolo, A. (2012) Advances in humeomics: enhanced structural identification of humic molecules after size fractionation of a soil humic acid. *Analytica Chimica Acta*, 720:77–90.
- Nehls, U. (2008) Mastering ectomycorrhizal symbiosis: the impact of carbohydrates. *Journal of Experimental Botany*, 59:1097-1108.
- Nehls, U., Béguiristain, 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.
- Nishi, T., Forgac, M. (2002) The vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nat. Mol. Cell Biol.* 3:94-103.
- Nitya, M.R., Suganthi, R. (2013) Screening of radical scavenging efficacy of melanin isolated from *Aspergillus fumigatus*. *International Journal of Pharma & Bio Sciences*, 4:312-318.
- Nosanchuck, J.D., Casadevall, A. (2003) The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cellular Microbiology*, 5:203-223.
- Nosanchuck, J.D., Casadevall, A. (2006) Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50:3519-3528.
- Nosanchuck, J.D., Stark, R.E., Casadevall, A. (2015) Fungal melanin: what do we know about structure? *Frontiers in Microbiology*, 6:1-7.
- Oancea, E., Vriens, J., Brauchi, S., Jun, J., Splawski, I., Clapham, D.E. (2009) TRPM1 forms ion channels associated with melanin content in melanocytes. *Science Signaling* 2:ra21.
- Orsi, M. (2014) Molecular dynamics simulation of humic substances. *Chem. Biol. Technol. Agr.*, 1:10. doi:10.1186/s40538-014-0010-4.
- 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.
- Paim, S., Linhares, L.F., Mangrich, A.S., Martin, J.P. (1990) Characterization of fungal melanins and soil humic acids by chemical analysis and infrared spectroscopy. *Biology and Fertility of Soils*, 10:72-76.



- Park, S.W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S. and Klessig, D.F. (2007) Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science*, 318:113–116.
- Paranjpe, M.S., Chen, P.K., Jong, S.C. (1978) Phenolic and other organic compounds in morphologically different tissues of *Agaricus bisporus*. *Trans. Mycol. Soc. Jpn.* 19:169–180.
- Parniske, M. (2008) Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6:763-775.
- Piattelli, M., Fattorusso, E., Nicolaus, R.A., Magno, S. (1965) The structure of melanins and melanogenesis—V: Ustilagomelanin. *Tetrahedron*, 21:3229-3236.
- Piccolo, A. (2002) The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Adv. Agronomy*, 75:57–134.
- Pickel, B., Schaller, A. (2013) Dirigent proteins: molecular characteristics and potential biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97:8427–8438.
- Pierson, E.S., Miller, D.D., Callaham, D.A., Shipley, A.M., Rivers, B.A., Cresti, M., Hepler, P.K. (1994) Pollen tube growth is coupled to the extracellular calcium ion flux and the intracellular calcium gradient: effect of BAPTA-type buffers and hypertonic media. *The Plant Cell*, 6:1815-1828.
- Pierson, E.S., Miller, D.D., Callaham, D.A., Van Aken, J., Hackett, G., Hepler, P.K. (1996) Tip-localized calcium entry fluctuates during pollen tube growth. *Developmental Biology*, 174:160-173.
- Pieslinger, A.M., Hoepflinger, M.C., Tenhaken, R. (2010) Cloning of glucuronokinase from *Arabidopsis thaliana*, the last missing enzyme of the myo-inositol oxygenase pathway to nucleotide sugars. *The Journal of Biological Chemistry*, 285:2902–2910.
- Plaxton, W.C., (1996) The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:185–214.
- Pogorelko, G., Lionetti, V., Bellincampi, D., Zabortina, O. (2013) Cell wall integrity. *Plant Signaling & Behavior*, 8:1-8.
- Portillo, F. (2000) Regulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in fungi and plants. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1469:31-42.
- Puhalla, J.E. (1975) Induction, isolation and characterization of mutants of *Verticillium dahliae* with deficiencies in melanin synthesis. *Proceedings of Beltwide Cotton Production Research Conferences*, 1-26.
- Ramos, A.C., Dobbss, L.B., Santos, L.A., Fernandes, M.S., Olivares, F.L., Aguiar, N.O., Canellas, L.P. (2015) Humic matter elicits proton and calcium fluxes and

signaling dependent on Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase (CDPK) at early stages of lateral plant root development. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 2:1-12.

Ramos, A.C., Façanha, A.R., Feijó, J.A. (2008) Proton (H<sup>+</sup>) flux signature for the presymbiotic development of the arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 178:177-188.

Ramos, A.C., Lima, P.T., Dias, P.N., Kasuya, M.C.M., Feijó, J.A. (2009) A pH signaling mechanism involved in the spatial distribution of calcium and anion fluxes in ectomycorrhizal roots. *New Phytologist*, 1:1-15.

Ramos, A.C., Martins, M.C., Façanha, A.R. (2005) Atividade ATPásica e pirofosfatásica em microssomos de raízes de milho colonizadas com fungos micorrízicos arbusculares. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, 29:207-213.

Rampey, R.A., LeClere, S., Kowalczyk, M., Ljung, K., Sandberg, G., Bartel, B. (2004) Family of auxin-conjugate hydrolases that contributes to free indole-3-acetic acid levels during arabidopsis germination. *Plant Physiology*, 135:978-988.

Raposo, G., Marks, M.S. (2002) The dark side of lysosome-related organelles: specialization of the endocytic pathway for melanosome biogenesis. *Traffic*, 3: 237–248.

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

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

Rayle, D.L., Cleland, R. (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*, 99:1271-12-74.

Rea, P.A., Sanders, D. (1987) Tonoplast energization: two H<sup>+</sup> 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.

Reis, R.S. de Moura Vale E., Heringer A.S., Santa-Catarina C., Silveira V. (2016) Putrescine induces somatic embryo development and proteomic changes in embryogenic callus of sugarcane. *J. Proteom.*, 130:170-179.

Revankar, S.G., Sutton, D.A. (2010) Melanized fungi in human disease. *Clinical Microbiology Reviews*. 23:884-928.

Robertson, K.L., Mostaghim, A., Cuomo, C.A., Soto, C.M., Lebedev, N., Bailey, R.F., Wang, Z. (2012) Adaptation of the black yeast *Wangiella dermatitidis* to ionizing radiation: molecular and cellular mechanisms. *PloS one*, 7:1-18.

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.G., Casadevall, A. (1997) Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. *FEMS Microbiology Letters*, 153:265-272.

Saiz-Jimenez, C., Shafizadeh, F. (1984) Iron and copper binding by fungal phenolic polymers: an electron spin resonance study. *Current Microbiology*, 10:281-285.

Sakaguchi, T., Nakajima, A. (1987) Accumulation of uranium by biopigments. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 40:133-141.

Saleh, Y.G., Mayo, M.S., Ahearn, D.G. (1988) Resistance of some common fungi to gamma irradiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 54:2134-2135.

Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., Harper, J.F. (2002) Calcium at the crossroads of signaling. *The Plant Cell*, 14:S401-S417.

Schachtman, D.P., Reid, R.J., Ayling, S.M. (1998) Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiology*, 116: 447-53.

Schiefelbein, J.W., Shipley, A., Rowse, P. (1992) Calcium influx at the tip of growing root-hair cells of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 187:455-459.

Schnitzer, M., Chan, Y.K. (1986) Structural characteristics of a fungal melanin and a soil humic acid. *Soil Science Society of America Journal*, 50:67-71.

Schulz, A., Beyhl, D., Marten, I., Wormit, A., Neuhaus, E., Poschet, G., Buttner, M., et al. (2011) Proton-driven sucrose symport and antiport are provided by the vacuolar transporters SUC4 and TMT1/2. *The Plant Journal*, 68:129–136.

Schumacher, K., Vafeados, D., McCarthy, M., Sze, H., Wilkins, T., Chory, J. (1999) The *Arabidopsis det3* mutant reveals a central role for the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in plant growth and development. *Genes & Development*, 13:3259–3270.

Scott, A.C., Allen, N.S. (1999) Changes in cytosolic pH within *Arabidopsis* root columella cells play a key role in the early signaling pathway for root gravitropism. *Plant Physiology*, 121:1291-1298.

Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B.M.A., Cammue, B.P.A., Bolle, M.F.C. (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46:941-950.

- Shoham, S., Levitz, S.M. (2005) The immune response to fungal infections. *British Journal of Haematology*, 129:569-582.
- Shuryak, I., Bryan, R.A., Nosanchuk, J.D., Dadachova, E. (2014) Mathematical modeling predicts enhanced growth of X-Ray irradiated pigmented fungi. *PloS one*, 9:1-7.
- Silva, M.B., Marques, A.F., Nosanchuk, J.D., Casadevall, A., Travassos, L.R., Taborda, C.P. (2006) Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes and Infection*, 8:197-205.
- 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.
- Slankis, V. (1973) Hormonal relationships in mycorrhizal development. In: G. C. Markse T. T. Kozlowski (eds.) *Ectomycorrhizae: their ecology and physiology*. ed. New York: Academic Press, p. 231–298.
- Šmejkalová, D., Piccolo, A. (2007) Aggregation and disaggregation of humic supramolecular assemblies by NMR diffusion ordered spectroscopy (DOSY-NMR). *Environ. Sci. Technol.*, 42:699–706.
- Smith, S.E., Read, D.J. *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd ed., London: Academic Press. p. 800. 2008.
- Smith, S.E., Smith, F.A. (2012). Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth. *Mycologia* 104: 1–13.
- Solano, F. (2014) Melanins: skin pigments and much more types, structural models, biological functions, and formation routes. *New J. Sci.* <http://dx.doi.org/10.1155/2014/498276>.
- Solano, F. (2016) Photoprotection versus photodamage: updating an old but still unsolved controversy about melanin. *Polym. Int.* 65:1276-1287.
- Sondergaard, T. E., Schulz, A., Palmgren, M. G. (2004). Energization of transport processes in plants. Roles of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Physiology*, 136(1), 2475-2482.
- Sorokin, H., Sommer, A.L. (1940) Effects of calcium deficiency upon the roots of *Pisum sativum*. *American Journal of Botany*, 308-318.
- Spartz, A.K., Ren, H., Park, M.Y., Grandt, K.N., Lee, S.H., Murphy, A.S., Sussman, M.R., Overvoorde, P.J., Gray, W.M. (2014) SAUR Inhibition of PP2C-D phosphatases activates plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases to promote cell expansion in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 26:2129–2142.

- Splivallo, R., Fischer, U., Göbel, C., Feussner, I., Karlovsky, P. (2009) Truffles regulate plant root morphogenesis via the production of auxin and ethylene. *Plant Physiology*, 150:2018-2029.
- Staley, J.T., Palmer, F., Adams, B. (1982) Microcolonial fungi: common inhabitants on desert rocks? *Science*, 215:1093-1095.
- Stepanova, A.N., Yun, J., Likhacheva, A.V., Alonso, J.M. (2007) Multilevel interactions between ethylene and auxin in Arabidopsis roots. *The Plant Cell Online*, 19:2169-2185.
- Sterflinger, K. (2000) Fungi as geologic agents. *Geomicrobiology Journal*, 17:97-124.
- Sterflinger, K. (2006) Black yeasts and meristematic fungi: ecology, diversity and identification. In: G. Péter, Rosa, C.A. (eds.) *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. ed. Springer, p. 501-514.
- Stüssi, H., Rast, D.M. (1981) The biosynthesis and possible function of  $\gamma$ -glutaminyl-4-hydroxybenzene in *Agaricus bisporus*. *Phytochemistry*, 20:2347-2352.
- Sun, J., Xu, Y., Ye, S., Jiang, H., Chen, Q., Liu, F., Zhou, W., Chen, R., Li, X., Tietz, O. (2009) Arabidopsis ASA1 is important for jasmonate-mediated regulation of auxin biosynthesis and transport during lateral root formation. *The Plant Cell Online*, 21:1495-1511.
- Sun, J., Zhang, J., Najafzadeh, M.J., Badali, H., Li, X., Xi, L., De Hoog, G.S. (2011) Melanization of a meristematic mutant of *Fonsecaea monophora* increases tolerance to stress factors while no effects on antifungal susceptibility. *Mycopathologia*, 172:373-380.
- 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* [*Pseudotsuga menziesii*]. *Phytopathology*, 73:390-397.
- Sze, H., Li, X., Palmgren, M., G. (1999) Energization of Plant Cell Membranes by H<sup>+</sup>-Pumping ATPases: Regulation and Biosynthesis. *Plant Cell*, 11:677-689.
- 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. *Fisiologia vegetal*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.
- Takahashi, K., Hayashi, K.-I., Kinoshita, T. (2012) Auxin activates the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by phosphorylation during hypocotyl elongation in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 159:632-641.

- Takano, Y., Kubo, Y., Kawamura, C., Tsuge, T., Furusawa, I. (1997) The *Alternaria alternata* melanin biosynthesis gene restores appressorial melanization and penetration of cellulose membranes in the melanin-deficient albino mutant of *Colletotrichum lagenarium*. *Fungal Genet. Biol.*, 21:131-140.
- Tazawa, M. (2003) Cell physiological aspects of the plasma membrane electrogenic H<sup>+</sup> pump. *Journal of Plant Research*, 116:419-442.
- Tian, S., Wang, X., Li, P., Wang, H., Ji, H., Xie, J., Qiu, Q., Shen, D., Dong, H. (2016) Plant aquaporin AtPIP1;4 links apoplastic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induction to disease immunity pathways. *Plant Physiology*, doi:10.1104/pp.15.01237.
- Tode, K., Lüthen, H. (2001) Fusicoccin-and IAA-induced elongation growth share the same pattern of K<sup>+</sup> dependence. *Journal of Experimental Botany*, 52:251-255.
- Turick, C.E., Ekechukwu, A.A., Milliken, C.E., Casadevall, A., Dadachova, E. (2011) Gamma radiation interacts with melanin to alter its oxidation-reduction potential and results in electric current production. *Bioelectrochemistry*, 82:69-73.
- Upadhyay, S., Xu, X., Lowry, D., Jackson Jennifer, C., Roberson Robert, W., Lin, X. (2016) Subcellular compartmentalization and trafficking of the biosynthetic machinery for fungal melanin. *Cell Rep.*, 14:2511-2518.
- Valot, B., Negroni, L., Zivy, M., Gianinazzi, S., Dumas-Gaudot, E. (2006) A mass spectrometric approach to identify arbuscular mycorrhiza-related proteins in root plasma membrane fractions. *Proteomics*, 6:S145-S155.
- Van De Sande, W.W.J., Kat, J., Coppens, J., Ahmed, A.O.A., Fahal, A., Verbrugh, H., Van Belkum, A. (2007) Melanin biosynthesis in *Madurella mycetomatis* and its effect on susceptibility to itraconazole and ketoconazole. *Microbes and Infection*, 9:1114-1123.
- Van Tichelen, K.K., Colpaert, J.V., Vangronsveld, J. (2001) Ectomycorrhizal protection of *Pinus sylvestris* against copper toxicity. *New Phytologist*, 150:203-213.
- Van Wees, S.C.M., Van der Ent, S., Pieterse, C.M.J. (2008) Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology*, 11:443-448.
- Velásquez, S.M., Barbez, E., Kleine-Vehn, J., Estevez, J.M. (2016) Auxin and cellular elongation. *Plant Physiology*, 170:1206-1215.
- Verchot-Lubicz, J., Goldstein, R.E. (2010) Cytoplasmic streaming enables the distribution of molecules and vesicles in large plant cells. *Protoplasma*, 240:99-107.
- Vincent, P., Chua, M., Nogue, F., Fairbrother, A., Mekeel, H., Xu, Y., Allen, N., Bibikova, T.N., Gilroy, S., Bankits, V.A. (2005) A Sec14p-nodulin domain

phosphatidylinositol transfer protein polarizes membrane growth of *Arabidopsis thaliana* root hairs. *The Journal of Cell Biology*, doi: 10.1083/jcb.200412074.

Volling, K., Thywissen, A., Brakhage, A.A., Saluz, H.P. (2011) Phagocytosis of melanized *Aspergillus* conidia by macrophages exerts cytoprotective effects by sustained PI3K/Akt signalling. *Cellular Microbiology*, 13:1130-1148.

Walker, C.A., Gomez, B.L., Mora-Montes, H.M., Mackenzie, K.S., Munro, C.A., Brown, A.J., Gow, N.A., Kibbler, C.C., Odds, F.C. (2010) Melanin externalization in *Candida albicans* depends on cell wall chitin structures. *Eukaryot. Cell*, 9: 1329-1342.

Wang, K.L.C., Li, H., Ecker, J.R. (2002) Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks. *The Plant Cell*, S131–S151.

Wang, Y., Aisen, P., Casadevall, A. (1995) *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. *Infection and Immunity*, 63:3131-3136.

Wang, Y., Casadevall, A. (1994) Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen-and oxygen-derived oxidants. *Infection and Immunity*, 62:3004-3007.

Weijn, A., Bastian-Net, S., Wichers, H.J., Mês, J.J. (2013) Melanin biosynthesis pathway in *Agaricus bisporus* mushroom. *Fungal Genetics and Biology*, 55:42-53.

Wheeler, M.H., Tolmsoff, W.J., Bell, A.A. (1978) Ultrastructural and chemical distinction of melanins formed by *Verticillium dahliae* from (+)-scytalone, 1,8-dihydroxynaphthalene, catechol, and L-3,4-dihydroxyphenylalanine. *Canadian Journal of Microbiology*, 24:289-297.

White, N.A., Boddy, L. (1992) Extracellular enzyme localization during interspecific fungal interactions. *FEMS microbiology letters*, 98:75-79.

Wobbes, B. (2004) Control of plant carbohydrate partitioning by the *Arabidopsis thaliana* ATB2 bZIP transcription factor gene. 1. ed. Amsterdam: F&N Boekservice, 106 p.

Wolfersberger, M.G. (1994) Uniporters, Symporters and Antiporters. *Journal of experimental Biology*, 196:5-6.

Woloshuk, C.P., Sisler, H.D., Vigil, E.L. (1983) Action of the antipenetrant, tricyclazole, on appressoria of *Pyricularia oryzae*. *Physiological Plant Pathology*, 22:245-IN21.

Wolkow, P., Sisler, H., and Vigil, E. (1983) Action of inhibitors of melanin biosynthesis on structure and function of apressoria of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiol. Plant. Pathol.*, 22: 55–71.

Wymer, C.L., Bibikova, T.N., Gilroy, S. (1997) Cytoplasmic free calcium distributions during the development of root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 12:427-439.

Yu, X., Huo, L., Chen, L., Wang, Y., Zhu, X. (2015) Melanin is required for the formation of the multi-cellular conidia in the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. *Microbiological Research*, 179:1-11.

Zaffagnini M, Michelet L, Marchand C, Sparla F, Decottignies P, et al. (2007) The thioredoxin-independent isoform of chloroplastic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is selectively regulated by glutathionylation. *FEBS J*, 274:212–226.

Zandonadi, D.B., Canellas, L.P., Façanha, A.R. (2007) Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H<sup>+</sup> pumps activation. *Planta*, 225:1583-1595.

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, J., Wang, L., Xi, L., Huang, H., Hu, Y., Li, X., Huang, X., Lu, S., Sun, J. (2013) Melanin in a meristematic mutant of *Fonsecaea monophora* inhibits the production of nitric oxide and Th1 cytokines of murine macrophages. *Mycopathologia*, 175:515-522.

Zhang, Z., Barlow, J.N., Baldwin, J.E., Schofield, C.J. (1997) Metal-catalyzed oxidation and mutagenesis studies on the Iron(II) binding site of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate Oxidase. *Biochemistry*, 36:15999-16007.

Zhdanova, N.N., Zakharchenko, V.A., Vember, V.V., Nakonechnaya, L.T. (2000) Fungi from Chernobyl: mycobiota of the inner regions of the containment structures of the damaged nuclear reactor. *Mycological Research*, 104:1421-1426.

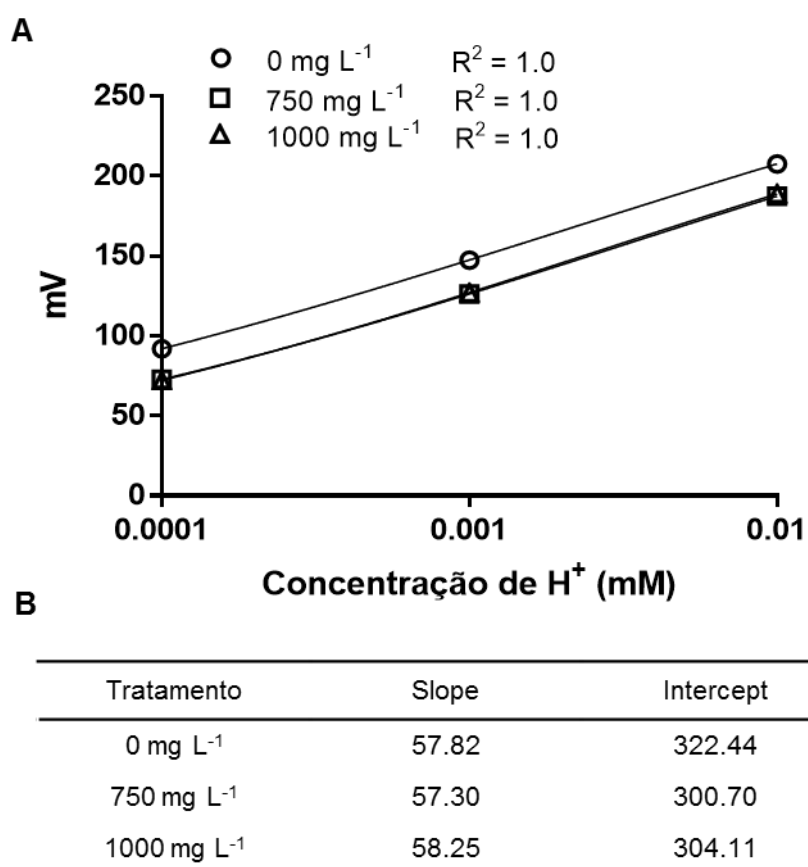
Zonia, L., Cordeiro, S., Tupý, J., Feijó, J.A. (2002) Oscillatory chloride efflux at the pollen tube apex has a role in growth and cell volume regulation and is targeted by inositol 3, 4, 5, 6-tetrakisphosphate. *The Plant Cell Online*, 14:2233-2249.

Zubieta, C., Kota, P., Ferrer, J-L., Dixon, R.A., Noel, J.P. (2002) Structural basis for the modulation of lignin monomer methylation by Caffeic Acid/5-Hydroxyferulic Acid 3/5-O-Methyltransferase. *The Plant Cell*, 14:1265–1277.

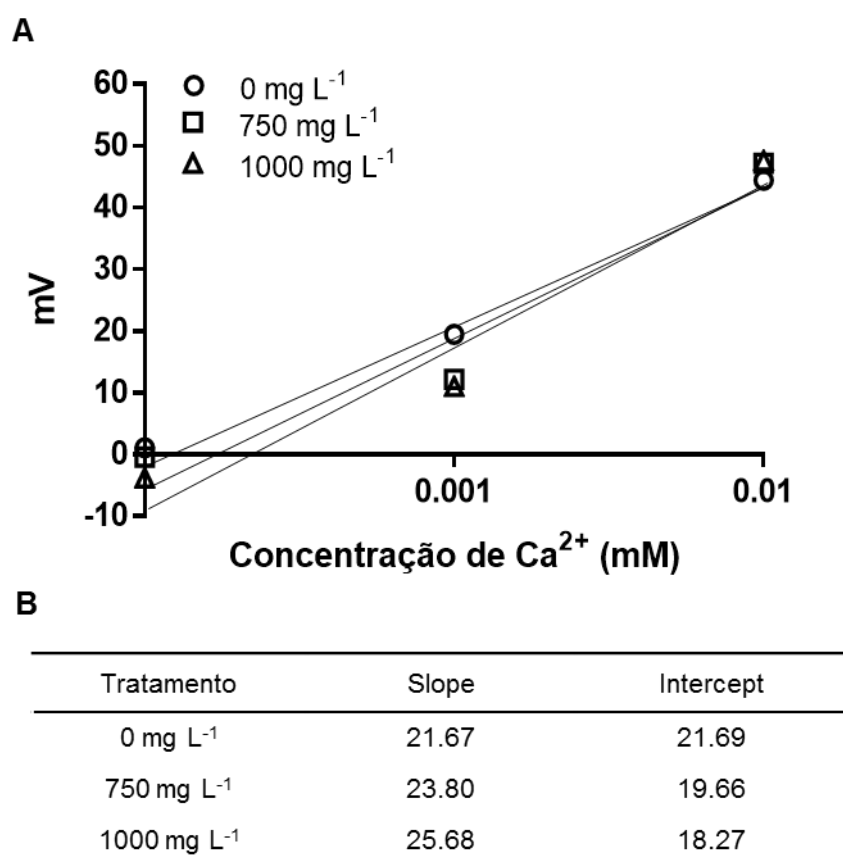
Zviagintsev, D.G., Mirchink, T.G. (1986) On the nature of soil humic acids. *Soviet Soil Science*, 5:68-75.



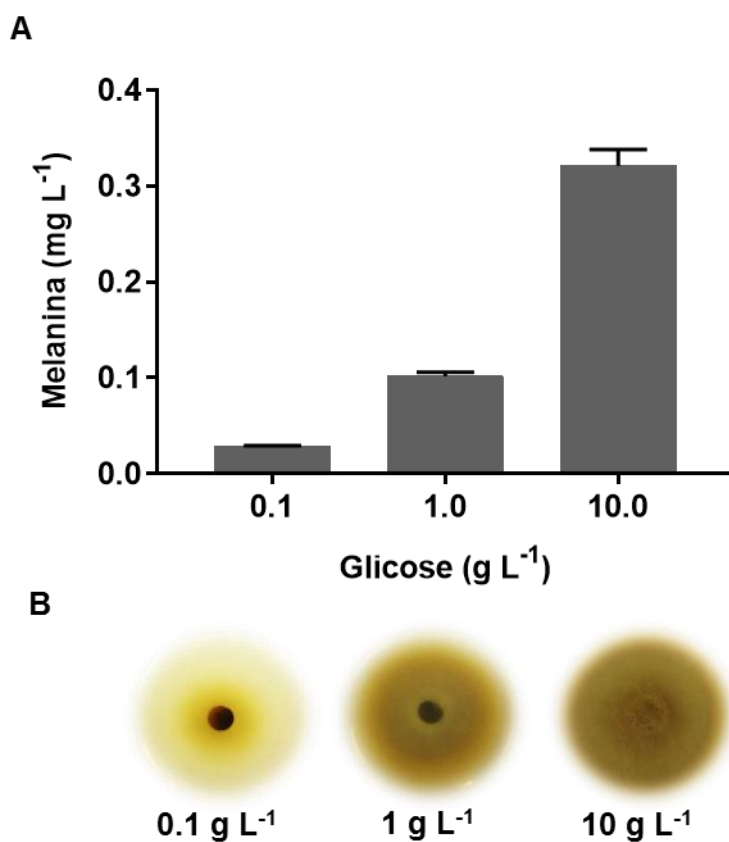
## APÊNDICES



**Figura S1.** (A) Linha de calibração do SIET para o ionóforo de H<sup>+</sup>. As soluções padrões cobrindo a faixa experimental do íon (0.0001; 0.001 e 0.1 mM) foram calibradas com 0, 750 ou 1000 mg L<sup>-1</sup> de melanina. (B) Valores de slope e intercept obtidos da linha de calibração do SIET para o ionóforo de H<sup>+</sup>.



**Figura S2.** (A) Linha de calibração do SIET para o ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$ . As soluções padrões cobrindo a faixa experimental do íon (0.0001; 0.001 e 0.1 mM) foram calibradas com 0, 750 ou 1000 mg L<sup>-1</sup> de melanina. (B) Valores de slope e intercept obtidos da linha de calibração do SIET para o ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figura S3.** (A) Quantificação da melanina exudada pelo fungo *Pisolithus tinctorius* crescido em meio sólido MNM com diferentes concentrações de glicose (0,1, 1 e 10 g L<sup>-1</sup>) (n=5). (B) Imagens do fungo *Pisolithus tinctorius* crescido em meio sólido MNM com diferentes concentrações de glicose (0,1, 1 e 10 g L<sup>-1</sup>).

## TABELAS SUPLEMENTARES

**Tabela S1.** Análise de variância (ANOVA) dos efeitos das concentrações de melanina e da condição de meio de medição, nos fluxos de H<sup>+</sup> da zona apical das raízes de *E. urograndis*. \*\*\*p<0.001; \*\*p<0.01; n.s. não significativo. GL=graus de Liberdade, SQ=soma dos quadrados, QM=quadrado médio.

Coeficiente	GL	SQ	QM	F
Condição de Medição	1	0.08395	0.08395	6783***
Concentrações de Melanina	5	0.0365	0.00693	559.9***
Condição de Medição x Concentrações de Melanina	5	0,007065	0.001413	114.2***
Resíduo	60	0,0007426	0,0000124	

**Tabela S2.** Análise de variância (ANOVA) dos efeitos das concentrações de melanina e da condição de meio de medição, no pH extracelular da zona apical das raízes de *E. urograndis*. \*\*\*p<0.001; \*\*p<0.01; n.s. não significativo. GL=graus de Liberdade, SQ=soma dos quadrados, QM=quadrado médio.

Coeficiente	GL	SQ	QM	F
Condição de Medição	1	5.027	5.027	1192****
Concentrações de Melanina	5	1.874	0.3748	88.85****
Condição de Medição x Concentrações de Melanina	5	2.307	0.4615	109.4****
Resíduo	60	0.2531	0.004218	

**Tabela S3.** Análise de variância (ANOVA) dos efeitos das concentrações de melanina e da condição de meio de medição, nos fluxos de Ca<sup>2+</sup> da zona apical das raízes de *E. urograndis*. \*\*\*p<0.001; \*\*p<0.01; n.s. não significativo. GL=graus de Liberdade, SQ=soma dos quadrados, QM=quadrado médio.

Coeficiente	GL	SQ	QM	F
Condição de Medição	1	28.39	28.39	1244****
Concentrações de Melanina	5	132.9	26.57	1164****
Condição de Medição x Concentrações de Melanina	5	6.4	1.28	56.1****
Resíduo	60	1.369	0.02282	

**Tabela S4.** Análise de variância (ANOVA) dos efeitos das concentrações de melanina e da condição de meio de medição, na concentração extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  da zona apical das raízes de *E. urograndis*. \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\* $p < 0.01$ ; n.s. não significativo. GL=graus de Liberdade, SQ=soma dos quadrados, QM=quadrado médio.

Coeficiente	GL	SQ	QM	F
Condição de Medição	1	0.01266	0.01266	1.097 n.s.
Concentrações de Melanina	5	2.293	0.4586	39.74****
Condição de Medição x Concentrações de Melanina	5	0.2628	0.05255	4.553**
Resíduo	60	0.6925	0.01154	