



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Medronheiro e Fungos Micorrízicos: parceria para o futuro

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal, realizada sob a orientação científica da Doutora Susana Gonçalves (Universidade de Coimbra) e da Professora Doutora Teresa Gonçalves (Universidade de Coimbra)

Daniela Filipa Pereira Dinis

2015

Agradecimentos

No final da realização deste trabalho, não posso deixar de agradecer a todas as pessoas, que das mais diversas formas contribuíram para a sua concretização.

Às minhas orientadoras, Doutora Susana Gonçalves e Professora Doutora Teresa Gonçalves por terem aceite a supervisão deste trabalho. Por todo o apoio e orientação, pelas sugestões, comentários e paciência na revisão do trabalho, os meus mais sinceros agradecimentos.

Ao Nuno Mesquita, por toda a ajuda na realização dos trabalhos moleculares, pelo esclarecimento de dúvidas e pela boa disposição.

Ao João Martins, por toda a paciência, sugestões, orientação na microscopia e esclarecimento da estatística.

À Lucie e à Ana por todo o companheirismo, pela amizade, pela alegria.

Ao meu namorado, pela cumplicidade e apoio nas alturas mais difíceis.

Finalmente à minha família, em especial aos meus pais, a quem expresso a minha maior gratidão pela oportunidade, pelo carinho e por acreditarem e me incentivarem ao longo do meu percurso académico.

ÍNDICE

Agradecimentos	i
i. Resumo	iv
ii. Abstract.....	vi
Introdução geral	8
01 Arbutus unedo L.	9
02 Simbioses Micorrízicas	11
03 Cenococcum geophilum Fr.....	14
04 Identificação molecular de fungos ectomicorrízicos	15
05 Objectivos e estrutura da tese	17
06 Bibliografia.....	19
Capítulo I	25
1.1. Introdução.....	26
1.2. Materiais e Métodos	27
1.2.1. Local de estudo	27
1.2.2. Amostragem de corpos frutíferos.....	28
1.2.3. Amostragem de solo e processamento de raízes.....	29
1.2.4. Identificação molecular de fungos micorrízicos	31
1.3. Resultados e Discussão	32
1.3.1. Corpos frutíferos	32
1.3.2. Morfotipos	38
1.3.3. Identificação molecular dos fungos nas micorrizas.....	39

1.4. Bibliografia.....	45
Capítulo II.....	47
2.1. Introdução.....	48
2.2. Materiais e Métodos	49
2.2.1. Propagação <i>in vitro</i> de <i>Arbutus unedo</i>	49
2.2.2. <i>Cenococcum geophilum</i>	50
2.2.3. Síntese micorrízica <i>in vitro</i>	51
2.2.4. Caracterização anatômica das micorrizas	53
2.3. Resultados e Discussão	54
2.3.1. Síntese micorrízica <i>in vitro</i>	54
2.3.2. Caracterização anatômica de micorrizas.....	57
2.4. Bibliografia.....	59
Conclusões e perspectivas futuras	61

i. Resumo

O medronheiro (*Arbutus unedo*) é uma espécie tipicamente mediterrânica e espontânea em Portugal, que ocorre frequentemente em associação com florestas de *P. pinaster*. Tem forte capacidade regenerativa após fogo e é tolerante a ambientes sujeitos a stress, sendo por isso uma espécie interessante para silvicultura em ambientes marginais e programas de reflorestação. *A. unedo* estabelece micorrizas com fungos basídio-e-ascomicetes (micorrizas arbutóides), que podem melhorar a tolerância do medronheiro a condições de stress. Por esse motivo, a inoculação controlada com fungos micorrízicos tem vindo a ser explorada como ferramenta útil em programas de melhoramento vegetal e de propagação de plantas, facilitando, por exemplo, a aclimação de plantas micropropagadas. Neste contexto, uma espécie fúngica de particular interesse é *Cenococcum geophilum*, que se encontra associado a *A.unedo* em condições naturais. Trata-se de um fungo ascomicete, cosmopolita, capaz de conferir tolerância à seca aos hospedeiros com que se associa.

Assim, os principais objectivos desta tese foram estudar a comunidade de fungos micorrízicos associada a *A. unedo* e *P. pinaster* em condições naturais e estabelecer um protocolo de micorrização controlada entre *A. unedo* e *C. geophilum*. Adicionalmente, na perspectiva do papel facilitador de *A. unedo* na mediação da regeneração de *P. pinaster* após perturbação, estudou-se o potencial para a formação de redes de micélio comuns. Para a realização do presente trabalho foi feita uma abordagem que combinou trabalho de campo, ferramentas moleculares, nomeadamente sequenciação de DNA e técnicas de cultura *in vitro*. Foram amostrados, em condições naturais, 10 medronheiros em duas estações (Outono e Primavera) e 10 pinheiros apenas na Primavera. Foram identificados 14 *taxa* de fungos micorrízicos associados ao medronheiro, 4 associadas ao pinheiro e 2 compartilhadas por ambos os hospedeiros. Foi ainda feito o estudo da comunidade de corpos frutíferos no mesmo local, tendo sido identificados 27 géneros, dos quais *Clitocybe*, *Cortinarius* e *Inocybe* foram os mais representativos. Este estudo permitiu, através do conhecimento da diversidade de corpos frutíferos e da comunidade de fungos micorrízicos associados ao medronheiro e ao pinheiro em condições naturais, saber quais os *taxa* mais frequentes e com maior abundância. O ensaio de micorrização controlada decorreu num período de 4 meses, no qual foi testada a influência de dois tipos de recipientes, assim como o momento de contacto fungo-planta, no desenvolvimento, sobrevivência e número

de plantas micorrizadas. O ensaio referido teve sucesso no que respeita à obtenção de plantas micorrizadas (demonstraram a presença de manto, rede de Hartig e penetração inter-e intracelular – características das micorrizas arbutóides). O tipo de recipiente teve influência na sobrevivência e desenvolvimento das plantas (parte aérea *vs* parte radicular) e o momento de contacto influenciou o número de plantas micorrizadas. O estabelecimento deste protocolo tem como objectivo a obtenção de plantas micorrizadas, na perspectiva do melhoramento desta espécie vegetal.

Palavras-chave: *Arbutus unedo* · *Pinus pinaster* · *Cenococcum geophilum* · Fungos micorrízicos · Região ITS · Micorrização controlada

*Este texto não foi escrito ao abrigo do novo Acordo Ortográfico.

ii. Abstract

The strawberry tree (*Arbutus unedo*) is a typically Mediterranean spontaneous species in Portugal, which frequently occurs in association with forests of *P. pinaster*. Has a high regenerative capacity after a fire and is tolerant to stress environments, so it's an interesting species for forestry in marginal environments and reforestation programs. *A. unedo* establish mycorrhizae with basidio-ascomycetes and fungi (Mycorrhizae arbutóides), wich can improve strawberry tree tolerance to stress conditions. For this reason, controlled inoculation with mycorrhizal fungi has been exploited as useful in plant breeding and plant propagation programs, facilitating, for example, acclimatization of micro propagated plants. In this context, a fungal species of particular interest is *Cenococcum geophilum*, which is associated with *A.unedo* under natural conditions. It's a cosmopolitan ascomycete fungus, able to confer tolerance to the hosts to which it is associated.

Therefore, the main objectives of this thesis were to study the mycorrhizal fungal community associated between *A. unedo* and *P. pinaster* in natural conditions and establish a controlled protocol of mycorrhization between *A. unedo* and *C. geophilum*. Additionally, as the *A. unedo* has a facilitating role of in mediating the regeneration of i after a disturbance, we studied the potential for the formation of common mycelium networks. To carry out this work, there was made an approach that combined field work, molecular tools, including DNA sequencing and in vitro culture techniques. They were sampled in natural conditions, ten arbutuses in two seasons (fall and spring) and ten pine trees only in spring. We have identified fourteen (taxa) of mycorrhizal fungi associated with the strawberry tree, four associated with pine tree and two shared by both hosts. It was also studied the community of fruiting bodies at the same location and twenty-seven genera were identified, of which *Clitocybe*, *Cortinarius*, and *Inocybe* were the most representative. This study allowed through knowledge of the diversity of fruiting bodies and mycorrhizal fungi community associated with the strawberry tree and the pine tree in natural conditions, what (taxa) occurs in most common and greater abundance. The controlled mycorrhization test was conducted in a four-month period, in which it was tested the effect of two types of containers, as well as the contact time fungus-plant development, survival and number of mycorrhizal plants. Such an assay has succeeded concerning obtaining mycorrhizal plants (they demonstrated the presence mantle, Hartig

network and inter and intracellular penetration - characteristics of mycorrhizae arbutóides). The type of container influenced the survival and development of plants (shoots vs. root part) and the contact time influence the number of mycorrhizal plants. The establishment of this protocol aims to obtain mycorrhizal plants, from the perspective of improvement of this plant species

Keywords: *Arbutus unedo* · *Pinus pinaster* · *Cenococcum geophilum* · Mycorrhizal *Fungi*· ITS region ·

01 *Arbutus unedo* L.

O medronheiro (*Arbutus unedo* L.) é uma espécie vegetal tipicamente mediterrânea que pertence à ordem Ericales e família Ericaceae. O género *Arbutus* possui cerca de 20 espécies, das quais apenas 4 existem bacia Mediterrânea: *A. unedo*, *A. andrachne*, *A. pavarii*, *A. andrachnoides*, e nas Ilhas Canárias *A. canariensis*, (Torres *et al.*, 2002).

A. unedo tem uma distribuição Mediterrânea (Figura 1 A), sendo encontrada na Europa ocidental, central e do sul, nordeste da África e nas Ilhas Canárias e Ásia ocidental, principalmente no litoral (Torres *et al.*, 2002). Em Portugal (Figura 1 B), *A. unedo* pode ser encontrada por todo o país (Pedro, 1994; Flora-On: Flora de Portugal Interactiva. (2014). Sociedade Portuguesa de Botânica. www.flora-on.pt. Consulta efectuada em 20-7-2015), mas ocorre maioritariamente a sul do Rio Tejo, na região das Serras do Caldeirão e Monchique (Algarve). As populações de medronheiro tendem a crescer associadas a outras árvores, em especial a espécies da família Fagaceae (e.g., *Quercus suber*) e de Pinaceae (e.g. *Pinus pinaster*; Prada & Arizpe, 2008; Gomes & Canhoto, 2009).

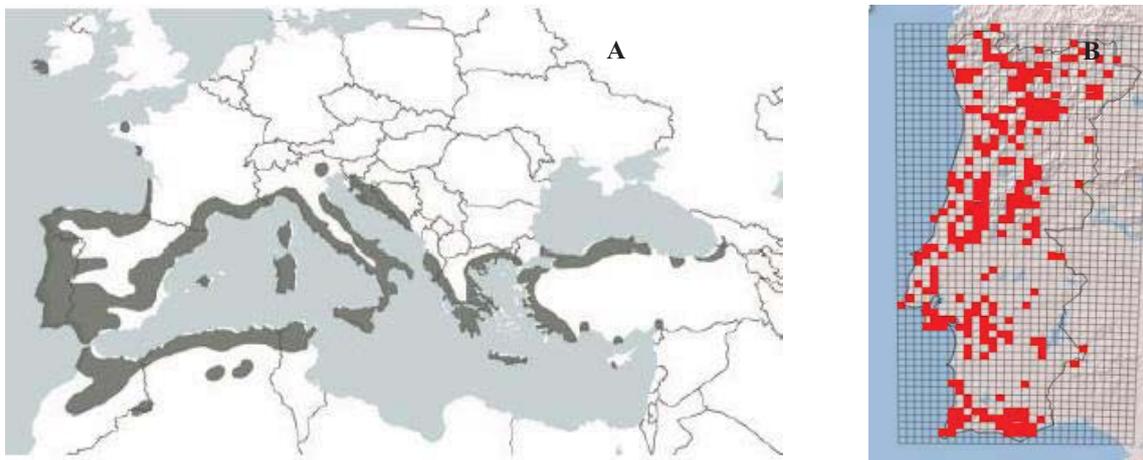


Figura 1. Distribuição de *Arbutus unedo*. (A) Na bacia mediterrânica e costa Atlântica. (Fonte: http://fieldart.blogspot.pt/2010_12_01_archive.html); (B) Em Portugal Continental (Fonte: <http://www.flora-on.pt/#wArbutus+unedo>. Consulta realizada em 20/07/2015).

Morfologicamente, o medronheiro apresenta porte arbustivo ou arbóreo, com uma altura entre 1,5 e 3 m, podendo ocasionalmente chegar aos 12 m (Figura 2 A). As folhas

são persistentes, simples, alternas, pecioladas, oblonga-lanceoladas geralmente serradas, de cor verde claro quando jovens e verde escuro intenso quando adultas, apresentando propriedades anti-sépticas e depurativas (Dib *et al.*, 2013). As epidermes das folhas apresentam uma camada de células com paredes espessas, cobertas por uma cutícula densa. As flores são hermafroditas, com a corola em forma de campânula, de cor esbranquiçada a rosada e dispostas em panículas pendentes, até 30 flores (Figura 2 B). A polinização é assegurada por insectos do género *Bombus* (Prada & Arizpe, 2008), sendo *A. unedo*, no Inverno a única fonte de néctar e pólen para *Bombus terrestris* (Rasmont *et al.*, 2005). O fruto é o medronho, uma baga esférica com cerca de 20 mm de diâmetro, coberta por papilas cónicas, de cor avermelhada e polpa amarela quando atinge a maturação (Figura 2 C). Os medronhos apresentam propriedades anti-sépticas, laxantes e diuréticas (Dib *et al.*, 2013; Martins 2012). O medronheiro possui um ciclo fenológico muito lento prolongando-se por quase dois anos. A floração ocorre em simultâneo com o amadurecimento e queda dos frutos do ano anterior (Flora-On: Flora de Portugal Interactiva. (2014). Sociedade Portuguesa de Botânica. www.flora-on.pt. Consulta efectuada em 20-7-2015). No Outono é possível observar simultaneamente no mesmo medronheiro, flores e frutos, dando-lhe um aspecto colorido que o torna especialmente interessante para fins ornamentais (Martins, 2012).

De uma perspectiva ecológica, o medronheiro ajuda a estabilizar os solos (Moreno-Jimenez *et al.*, 2008), tem forte capacidade de regeneração após fogo (Tujeira & Morgado, 2007), e é capaz de sobreviver em ambientes hostis (Gomes *et al.*, 2013) - revelando, em particular elevada tolerância à seca, e por isso tem vindo a ser utilizado em programas de reflorestação (Martins, 2012). A sua importância económica prende-se com o seu uso ornamental, com a produção de frutos (para alimentação, produção de licores, água-ardente e compotas), com a utilização das folhas na medicina tradicional e, por último, com a sua utilização na indústria química devido à produção de taninos (Kivçak & Mert, 2001; Gulay *et al.*, 2008).

No decorrer do crescente interesse no medronheiro nos últimos anos, surgiu a necessidade de implementação em Portugal de um programa de melhoramento desta espécie (Gomes & Canhoto, 2009). Nos últimos anos, o Laboratório de Biotecnologia

Vegetal, do Departamento de Ciências da Vida (Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra), tem desenvolvido trabalho de investigação que visa o melhoramento (métodos de clonagem *in vitro* e selecção), micropropagação e divulgação do medronheiro.

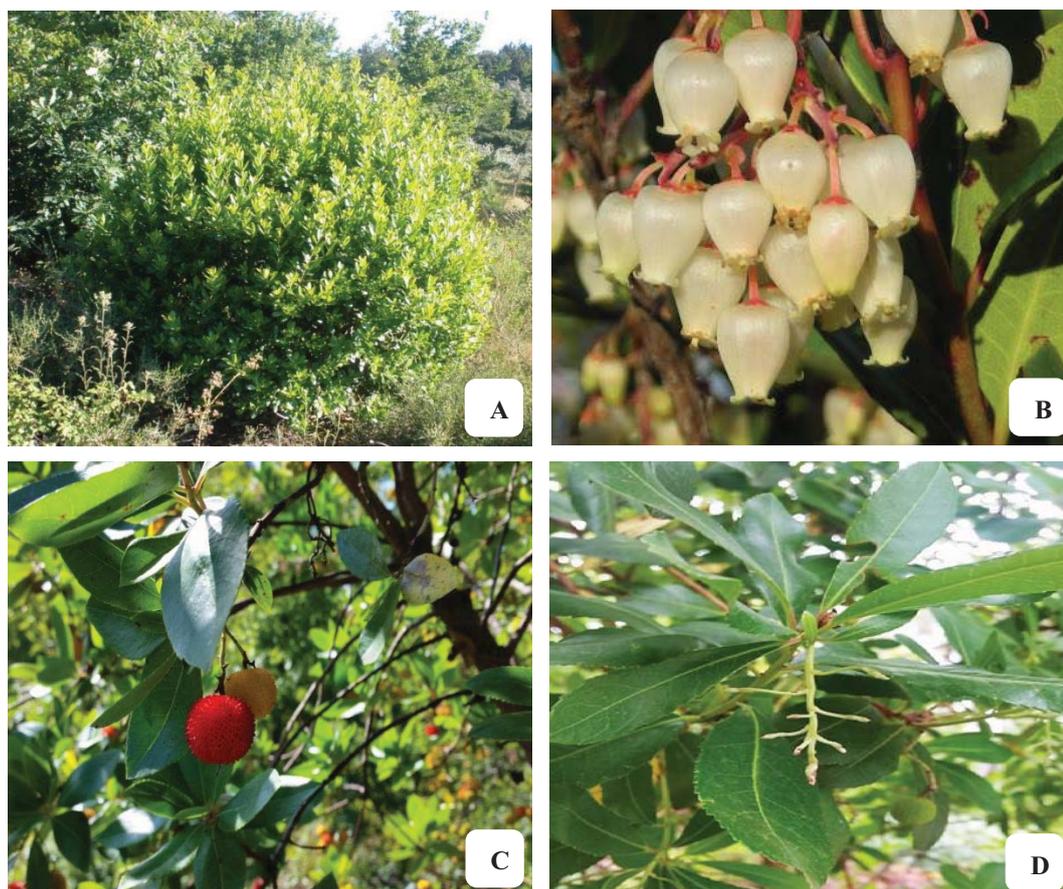


Figura 2. *Arbutus unedo*. (A) Planta. (B) Panículas pendentes; Fonte: http://fazeredesfazer.blogspot.pt/2011_12_01_archive.html. (C) Frutos em diferentes estados de maturação. (D) Botões florais em Julho.

02 Simbioses Micorrízicas

Nos ecossistemas terrestres, na interface solo-raiz existem simbioses micorrízicas, entre fungos filamentosos do solo e as raízes das plantas, em que os fungos auxiliam as plantas hospedeiras na nutrição mineral, promovendo o seu crescimento e a resistência, e em troca recebem carbono (Johansson *et al.*, 2015). Grande parte dos fungos micorrízicos

não apresenta especificidade e um único fungo pode colonizar simultaneamente uma diversidade de plantas (Van der Heijden & Horton, 2009). Do mesmo modo, uma planta pode associar-se a diversas espécies fúngicas. Esta falta de especificidade leva à partilha de fungos micorrízicos entre espécies vegetais, através da existência de redes de micélio comuns.

Podem distinguir-se 6 tipos diferentes de micorrizas com base na morfologia da micorriza, características do fungo e da planta hospedeira (Tabela 1): (1) micorrizas arbusculares (AM); (2) ectomicorrizas (ECM); (3) ectendomicorrizas; (4) micorrizas arbutóides; (5) micorrizas monotropóides; (6) micorrizas ericóides; (7) micorrizas orquidóides. A maioria das plantas forma apenas um tipo de associação, sendo as AM e as ECM os tipos mais comuns. No entanto, há casos como o género *Quercus*, em que as plantas são capazes de formar dupla associação, ou seja, AM e ECM (Querejeta *et al.*, 2009).

Tabela 1. Características dos diferentes tipos de micorrizas.

	Arbusc.	Ecto.	Ectendo.	Arbut.	Mono.	Eric.	Orqui.
Colonização intracelular	+	-	+	+	+	+	+
Bainha fúngica	-	+	+/-	+	+	-	-
Manto fúngico	-	+	+	+	+	-	-
<i>Taxa</i> de fungos	Glome	Basidio/ Asco	Basidio/ Asco	Basidio/ Asco	Basidio	Asco	Basidio
	Bryo	Gymno	Gymno			Ericales	
	Pterido	Angio	Angio			Bryo	
<i>Taxa</i> de plantas	Gymno			Ericales	Monotropaceae		Orchidaceae
	Angio						

Os tipos de micorrizas estão abreviados de Arbuscular, Ectomicorriza, Ectendomicorriza, Arbutóide, Monotropóide, Ericóide e Orquidóide; os *taxa* de fungos estão abreviados de Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota; os *taxa* de plantas de Bryophyta, Pteridophyta, Gymnospermae e Angiospermae.

As espécies do género *Arbutus*, estabelecem associações simbióticas com fungos basídio- e ascomicetes, de morfologia e anatomia particulares, - micorrizas arbutóides, assim designadas por serem típicas e exclusivas dos géneros *Arbutus*, *Archostaphylos* e *Pyrola* (Smith & Read, 1997). Em adição ao manto de hifas fúngicas e ao crescimento intercelular (rede de Hartig) que caracterizam as ECM, nas micorrizas arbutóides acresce a penetração intracelular das células epidérmicas (Figura 3; Smith & Read, 1997). Os fungos envolvidos na associação com *A. unedo* são semelhantes das ECM.

Os fungos ectomicorrízicos (ECM) são descritos como sendo fundamentais na melhoria da nutrição (captação de catiões minerais, fósforo e azoto) e na protecção das plantas contra parasitas e compostos tóxicos do solo, o que os torna extremamente importantes em locais muito pobres e com nutrientes limitados (Smith & Read, 1997; Aučina *et al.*, 2011). Os fungos ECM estão envolvidos em relações simbióticas com espécies vegetais de florestas temperadas, boreais e tropicais (Jany *et al.*, 2003; Richard *et al.*, 2005) e podem ser encontrados em cerca de 90% das árvores em florestas temperadas e boreais (Qu Laiye *et al.*, 2003). A elevada diversidade de fungos ECM, assim como a existência de redes de micélio são importantes para o funcionamento dos ecossistemas e auxiliam na sua recuperação após perturbações naturais e/ou antropogénicas. (Jany *et al.*, 2003; Kennedy *et al.*, 2012).

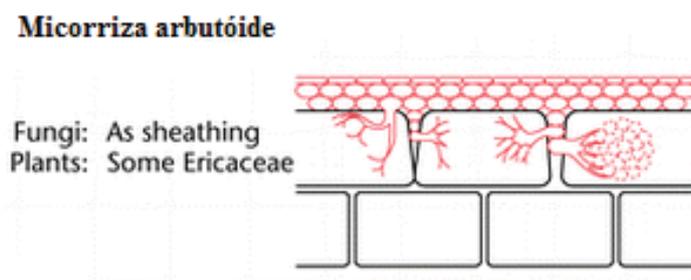


Figura 3. Representação esquemática de micorriza arbutóide. C, carbono (açúcares); N, azoto; P, fósforo. (Adaptado de Read, 2001)

03 *Cenococcum geophilum* Fr.

Cenococcum geophilum Fr. é um fungo ECM cosmopolita (Gonçalves *et al.*, 2007), descrito pela primeira vez em 1800 por J. Sowerby como *Lycoperdon graniforme* (Mina, 2013).

É um dos fungos ECM mais frequentes, tem ampla distribuição ecológica e geográfica e associa-se a gimnospérmicas e angiospérmicas (Trappe, 1964) incluindo *A. unedo* (e.g. Richard *et al.*, 2005). Tem ainda capacidade pioneira (Wu *et al.*, 2005), embora também esteja presente em povoamentos adultos (Fernández-Toirán & Águeda, 2007).

Trata-se de um ascomicete, sem reprodução sexuada conhecida, mas apesar disso com elevada diversidade genética (Gonçalves *et al.*, 2007; LoBuglio *et al.*, 2002), tendo vários estudos (e.g. Bourne *et al.*, 2014) sugerido a existência de um estado sexual críptico ou ciclo parasexual. Uma vez que este fungo não produz quaisquer tipos de esporos ou estruturas reprodutivas além de esclerócios (estruturas vegetativas de resistência que permitem isolar o fungo e cultivar *in vitro*; Figura 4 D), a sua posição a nível taxonómico ficou sem resposta até há relativamente pouco tempo. No entanto, estudos filogenéticos recentes posicionam-no na classe Dothideomycetes (Spatafora *et al.*, 2012). A dispersão dos esclerócios é feita através do vento, água e animais (Massicotte *et al.* 1992; Trappe, 1969).

Comparativamente a outros fungos ECM, *C. geophilum* tem sido relatado como tolerante ao stress hídrico (Coleman *et al.*, 1989), sendo bastante comum em habitats com escassez de água. Esta característica funcional parece dever-se à produção de melanina (Fernandez & Koide, 2013; Kerner *et al.*, 2012) e, por sua vez, parece conferir vantagem ao hospedeiro a que se associa no combate à seca (Pigott, 1982; Di Pietro *et al.*, 2007). É uma das poucas, se não a única, espécie micorrízica identificada rotineiramente com base na morfologia das ECM (Ingleby *et al.*, 1990). Segundo a aparência macroscópica, são visíveis micorrizas curtas, frequentemente claviformes com as hifas de cor preta, observadas frequentemente a expandirem-se a partir da superfície do manto e com

tendência a desaparecer à medida que a micorriza envelhece (Figura 4 A, B) (Ingleby *et al.*, 1990).

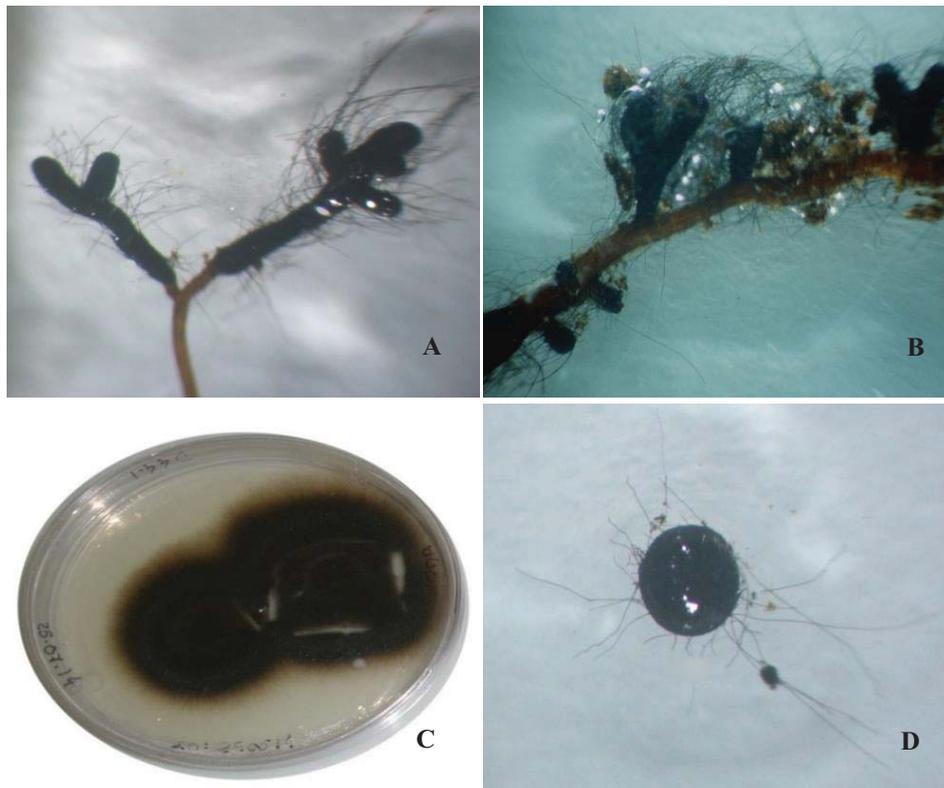


Figura 4. *Cenococcum geophilum*. (A) Micorrizas: *C. geophilum* associado a *A.unedo*. (B) Micorrizas: *C. geophilum* associado a *P.pinaster*. (C) Cultura de *C. geophilum* em meio agarizado. (D) Esclerócio.

04 Identificação molecular de fungos ectomicorrízicos

O micélio dos fungos ECM ocorre em grande parte debaixo do solo, o que dificulta a sua investigação e identificação. Por isso, antes do acesso a ferramentas moleculares, a taxonomia destes organismos e conseqüentemente, o estudo das comunidades ECM era baseada na colheita, quantificação e identificação dos corpos frutíferos (Horton & Bruns, 2001).

O avanço metodológico mais importante no estudo de comunidades de fungos ECM foi a aplicação da reacção em cadeia da polimerase (PCR, do inglês Polymerase Chain Reaction). Esta técnica, descrita em meados da década de 80 por Mullis e colaboradores (Mullis & Faloona, 1987), permite obter *in vitro* várias cópias de um determinado segmento de DNA e é particularmente importante para a identificação de espécies fúngicas devido à sua sensibilidade e especificidade. Para a obtenção dos segmentos de DNA é necessário proceder às seguintes etapas: a) extracção de DNA molde, ou seja, que contém a região a ser amplificada; b) obtenção de *primers* específicos para o reconhecimento desse segmento; c) amplificação que dará origem a várias cópias, fazendo-se uso de um termociclador e d) leitura do produto amplificado após electroforese. A PCR pode ser utilizada para detectar grupos de linhagens, espécies ou taxa superiores (Fungaro, 2000).

Uma vez que a PCR permite trabalhar com quantidades muito pequenas de DNA e não exige um elevado grau de pureza, é possível trabalhar com amostras extraídas a partir de ambientes complexos, como solos, rios, alimentos (Fungaro, 2000) e micorrizas. De particular interesse para a identificação de fungos é a amplificação de regiões específicas do genoma, como o Espaço Interno Transcrito (ITS), localizado entre regiões altamente conservadas, correspondentes aos genes 18S e 28S. Estes genes são separados por regiões denominadas ITS1 e ITS2, as quais são transcritas e processadas para dar origem ao RNA ribossómico (Figura 5), sendo os *primers* universais ITS1 e ITS4 os mais comumente utilizados na amplificação desta região (Gardes & Bruns, 1993). A região ITS é altamente conservada na espécie, mas é variável entre espécies, sendo frequentemente utilizada para delimitar espécies (Horton & Bruns, 2001).

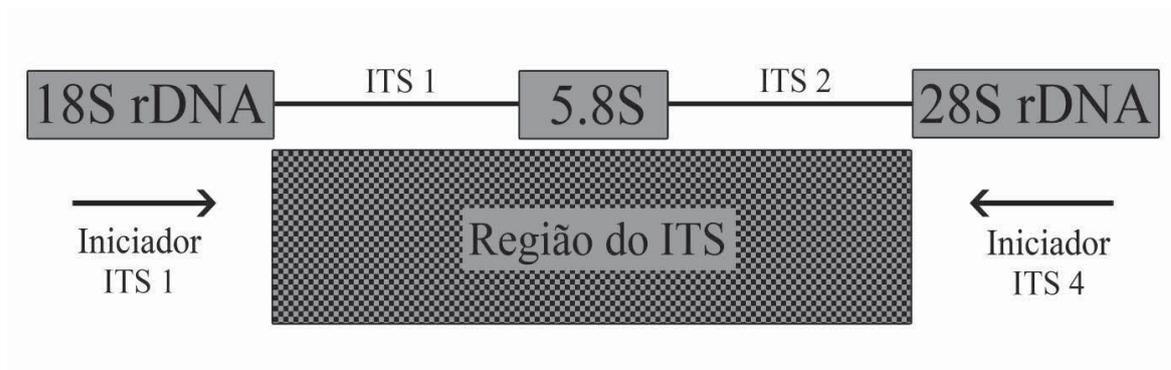


Figura 5. Região do rDNA com o espaço interno transcrito ITS1 e ITS4.

05 Objectivos e estrutura da tese

A tese foi desenvolvida no contexto do projecto de investigação PTDC/AGR-FOR/3746/2012, que tem entre outros, o objectivo de caracterizar a comunidade de fungos micorrízicos associados a *A. unedo* em condições naturais e o desenvolvimento de protocolos de micorrização controlada. Adicionalmente, tirando partido do facto de, no local de estudo, a população de pinheiro-bravo (*P. pinaster*) apresentar regeneração natural após corte por infestação com nemátode do pinheiro (*Bursaphelenchus xylophilus*), investigou-se o potencial para a formação de redes de micélio comuns entre *A. unedo* e *P. pinaster* na perspectiva de um efeito facilitador de *A. unedo* nessa regeneração mediado pelos fungos ECM.

Assim, o trabalho de investigação descrito teve como objectivos 1) conhecer a comunidade de fungos micorrízicos associados a *Arbutus unedo* e a *Pinus pinaster* em condições naturais; 2) investigar o potencial para a formação de redes de micélio comuns entre *A. unedo* e *P. pinaster* e 3) desenvolver um protocolo de micorrização controlada de *A.unedo* com *C. geophilum*.

De acordo com os objectivos, a tese está organizada da seguinte forma:

Introdução geral: Sumariza-se o contexto teórico e experimental da tese.

Capítulo I: *Comunidade de fungos micorrízicos associada a A. unedo e P. pinaster em condições naturais.* Neste trabalho inventariaram-se os carpóforos presentes no local de estudo e identificaram-se os fungos ECM ao nível das raízes, a partir das micorrizas de *A. unedo* e de *P. pinaster*.

Capítulo II: *Protocolo de micorrização controlada entre A. unedo e C. geophilum.* Foram estabelecidos dois ensaios com diferentes variáveis, com o propósito de obtenção de plantas micorrizadas.

06 Bibliografia

Aučina, A., Rudawska, M., Leski, T., Ryliškis, D., Pietras, M., Riepšas, E. (2011). Ectomycorrhizal fungal communities on seedlings and conspecific trees of *Pinus mugo* grown on the coastal dunes of the Curonian Spit in Lithuania. *Mycorrhiza* 21:237–245

Bourne, E.C., Mina, D., Gonçalves, S.C., Loureiro, J., Freitas, H., Muller, L.a.H. (2014). Large and variable genome size unrelated to serpentine adaptation but supportive of cryptic sexuality in *Cenococcum geophilum*. *Mycorrhiza*, 24:13-20.

Coleman, M.D., Bledsoe, C.S. & W. Lopushinsky (1989). Pure culture response of ectomycorrhizal fungi to imposed water stress. *Canadian Journal of Botany* 67:29-39.

Córdoba, A. S., Mendonça, M. M., & Araújo, E. F. (2002). Avaliação da diversidade genética de fungos micorrízicos arbusculares em três estádios de estabilização de dunas. *Revista brasileira de ciência do solo*, 26 (4), 931-937.

Di Pietro, M.; Churin, J., Garbaye. J. (2007). Differential ability of ectomycorrhizas to survive drying. *Mycorrhiza* 17:547 – 550.

Dib, M.E., Allali, H., Bendiabdellah, A., Meliani, B., Tabti, B. (2013). Antimicrobial activity phytochemical screening of *Arbutus unedo* L. *Journal of Saudi chemical society* 17,381-385.

Douhan, G.W. & Rizzo, D.M. (2005). Phylogenetic divergence in a local population of the ectomycorrhizal fungus. *New Phytologist*, 166:263-271.

Fernandez, C.W. & Koide, R.T. (2013). The function of melanin in the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum* under water. *Fungal ecology* 6,479-486.

Fernández-Toirán, L. M., & Águeda, B. (2007). Fruitbodies of *Cenococcum geophilum*. *Mycotaxon*, 100, 109-114.

Flora-On: Flora de Portugal Interactiva. (2014). Sociedade Portuguesa de Botânica. www.flora-on.pt. Consulta efectuada em 18-7-2015.

Fungaro, M. H. P. (2000). PCR na micologia. *Biocologia Ciência & Desenvolvimento*, 14, 12-16.

Gomes, F., Machado, H., San Martin, E., Portugal, A., & Canhoto, J. M. (2013). Mycorrhizal synthesis between *Pisolithus arhizus* and adult clones of *Arbutus unedo* *in vitro* and *in nursery*. *Journal of forestry research*, 24(4), 659-670.

Gomes, F. & Canhoto, J.M. (2009) Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants. *In Vitro Cellular & Development Biology Plant* 45, 72-82.

Gonçalves, S. C., Portugal, A., Gonçalves, M. T., Vieira, R., Martins-Loução, M. A., & Freitas, H. (2007). Genetic diversity and differential *in vitro* responses to Ni in *Cenococcum geophilum* isolates from serpentine soils in Portugal. *Mycorrhiza*, 17(8), 677-686.

Gulay, C., Demirsoy, L., Demirsoy, H. (2008). The strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) selection in Turkey. *Scientia Horticulturae* 118,115-119.

Horton, T. R., & Bruns, T. D. (2001). The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular ecology*, 10(8), 1855-1871.

Ingleby, K., Mason, P. A., Last, F. T., & Fleming, L. V. (1990). Identification of ectomycorrhizas. ITE research publication no. 5. Institute of Terrestrial Ecology.

Jany, J. L., Martin, F., & Garbaye, J. (2003). Respiration activity of ectomycorrhizas from *Cenococcum geophilum* and *Lactarius* sp. in relation to soil water potential in five beech forests. *Plant and Soil*, 255(2), 487-494.

Johansson, V.A., Mikusinska, A., Ekblad, A., Eriksson, O. (2015). Partial mycoheterotrophy in Pyroleae: nitrogen and carbon stable isotope signatures during development from seedling to adult. *Oecologia* 177:203–211.

Kennedy, P., Smith, D., Horton, T., Molina, R. (2012). *Arbutus menziesii* (Ericaceae) facilitates regeneration dynamics in mixed evergreen forests by promoting mycorrhizal fungal diversity and host connectivity. *American Journal of Botany* 99(10): 1691–1701.

Kerner, R., Delgado-Eckert, E., Del Castillo, E., Müller-Starck, G., Peter, M., Kuster, B., & Pritsch, K. (2012). Comprehensive proteome analysis in *Cenococcum geophilum* Fr. as a tool to discover drought-related proteins. *Journal of proteomics*, 75(12), 3707-3719.

Kivçak, B. & Mert, T. (2001). Quantitative determination of alpha-tocopherol in *Arbutus unedo* by TLC-densitometry and colorimetry. *Fitoterapia* 72,656-661.

Liu, Y. J., & Hall, B. D. (2004). Body plan evolution of ascomycetes, as inferred from an RNA polymerase II phylogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(13), 4507-4512.

LoBuglio, K. F., Berbee, M. L., & Taylor, J. W. (1996). Phylogenetic Origins of the Asexual Mycorrhizal Symbiont *Cenococcum geophilum* Fr. and Other Mycorrhizal Fungi among the Ascomycetes. *Molecular phylogenetics and evolution*, 6(2), 287-294.

Lupatini, M., Mello, A. H. D., & Antonioli, Z. I. (2008). Caracterização do DNA ribossômico do isolado de Scleroderma UFSMSc1 de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex- maiden. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, 32.

Martins, J.F.S. Estudos de cultura *in vitro* em medronheiro (*Arbutus unedo* L.) aplicados ao seu melhoramento [dissertação de mestrado]. Universidade de Coimbra: Faculdade de Ciências e Tecnologias; 2012.

Massicotte, H.B., Trappe, J.M., Peterson, R.L. & L.H. Melville (1992). Studies on *Cenococcum geophilum*. II. Sclerotium morphology, germination and formation in pure culture and growth pouches. *Canadian Journal of Botany* 70:125-132;

Mina, J.D.C. Relationship between genome size, serpentine adaptation and cryptic sexuality in the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum* [dissertação de mestrado]. Universidade de Coimbra: Faculdade de Ciências e Tecnologias; 2013.

Moreno-Jiménez, E., Penalosa, J. M., Carpena-Ruiz, R. O., & Esteban, E. (2008). Comparasion of arsenic resistance in Mediterranean woody shrubs used in restoration activities. *Chemosphere* 71(3),466-473.

Pedro, J. G. (1994). Portugal Atlas do Ambiente. Notícia Explicativa II.6. Carta da distribuição de figueira e medronheiro. Lisboa: Ministério do Ambiente e Recursos Naturais.

Mullis, K. & Faloona, F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology*. 55: 335-350.

Pigott, C.D. (1982). Survival of mycorrhiza formed by *Cenococcum geophilum* f[^]. In dry soils. *New Phytat*. 92, 513-517.

Prada, M.A. & Arizpe, D. (2008). Riparian tree and shrub propagation handbook. Valencia pp. 27-29 ISBN 978-84-482-4965-6.

Qu L.Y., A.M. Quoreshi, K. Iwase, Y. Tamai, R. Funada and T. Koike. (2003). *In vitro* ectomycorrhiza formation on two larch species of seedlings with six different fungal species. *Eurasian J. For. Res.* 6:65–73.

Querejeta, J., Egerton-Warburton, L.M., Allen M.F. (2009). Topographic position modulates the mycorrhizal response of oak trees to interannual rainfall variability. *Ecology*, 90(3), 2009, pp. 649–662.

Rasmont, P., Regali, A., Ings, T. C., Lognay, G., Baudart, E., Marlier, M., & Chittka, L. (2005). Analysis of pollen and nectar of *Arbutus unedo* as a food source for *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 98(3), 656-663.

Read, D.J. (2001). Mycorrhiza. Encyclopedia of life sciences. John Wiley & Sons, Ltd., www.els.net.

Richard, T., Millot, S., Gardes, M., Selosse, M-A. (2005). Diversity and specificity of ectomycorrhizal fungi retrieved from an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex*. *New Phytologist* 166: 1011–1023.

Smith, S.E. &, Read, D.J. (1997) Mycorrhizal symbiosis. 2nd Academic, London.

Spatafora, J. W., Owensby, C. A., Douhan, G. W., Boehm, E. W., & Schoch, C. L. (2012). Phylogenetic placement of the ectomycorrhizal genus *Cenococcum* in Gloniaceae (Dothideomycetes). *Mycologia*, 104(3), 758-765.

Torres, J.A., Valle, F., Pinto, C., García-Fuentes, A., Salazar, C. & Cano, E. (2002). *Arbutus unedo* L. communities in southern Iberian Peninsula mountains. *Plant Ecology* 160, 207-223.

Trappe, J.M. *Cenococcum graniforme* – its distribution, ecology, mycorrhiza, formation and inherent variation [tese de doutoramento]. University of Washington;1962.

Trappe, J.M. (1964). Mycorrhizal host and distribution of *Cenococcum graniforme*. *Lloydia* 27:100-106;

Trappe J.M. (1969). Studies on *Cenococcum graniforme*. I. An efficient method for isolation from sclerotia. *Canadian Journal of Botany* 47:1389-1390.

Tujeira, R., Morgado, R. (2007). Resposta de diferentes espécies florestais ao fogo- Um estudo de caso relativo aos incêndios de 2006 na região de Porto-de-Mós/Tomar. Relatório técnico no âmbito do projecto “Recuperação de Áreas Ardidas”. Centro de Ecologia Aplicada “Prof.Baeta Neves”, Instituto Superior de Agronomia.

Van der Heijden, M.G.A., Horton, T.R. (2009). Socialism in soil? The importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems. *Journal of Ecology* 2009, 97, 1139–11.

Wu, B., Nara, K., & Hogetsu, T. (2005). Genetic structure of *Cenococcum geophilum* populations in primary successional volcanic deserts on Mount Fuji as revealed by microsatellite markers. *New Phytologist*, 165(1), 285-293.

Comunidade de fungos micorrízicos associada a *Arbutus unedo* e o potencial para a formação de redes de micélio comuns com *P. pinaster*

1.1. Introdução

O medronheiro é um arbusto comum no sub-bosque de pinheiro-bravo (*Pinus pinaster*) em Portugal e desempenha um papel importante na recuperação do ecossistema após perturbação (Moreno-Jimenez *et al.*, 2008; Tujeira & Morgado, 2007; Gomes *et al.*, 2013). Estudos de Buscardo e colaboradores (2012) relacionaram este efeito positivo com a colonização micorrízica. No entanto, ainda existem poucos estudos de base molecular das comunidades de fungos ectomicorrízicos (ECM) associados a *Arbutus unedo* e do potencial para a formação de redes de micélio comuns com *P. pinaster*. A maioria dos fungos ECM forma corpos frutíferos (superiores a 1 mm), os cogumelos. No entanto nem todos os fungos ECM produzem carpóforos, como é o caso de *Cenococcum geophilum*.

O principal objectivo do trabalho apresentado neste capítulo foi conhecer a comunidade de fungos micorrízicos ECM associada ao medronheiro e ao pinheiro-bravo em condições naturais num local de estudo localizado em Tábua, distrito de Coimbra. A população de pinheiro-bravo existente no local de estudo foi cortada após infestação com nemátode-do-pinheiro (*Bursaphelenchus xylophilus*) e houve regeneração natural. Esta situação proporcionou a possibilidade de avaliar se os fungos que colonizam o medronheiro poderiam mediar a regeneração de pinheiros. Assim, adicionalmente investigou-se o potencial para a formação de redes de micélio comuns entre *A. unedo* e *P. pinaster* pela identificação das espécies fúngicas partilhadas entre as duas espécies vegetais. As comunidades fúngicas foram estudadas através da diversidade de corpos frutíferos de fungos ECM presentes no campo e pela observação das micorrizas em ambos os hospedeiros com posterior identificação molecular (sequenciação da região ITS) dos *taxa* fúngicos envolvidos na simbiose.

1.2. Materiais e Métodos

1.2.1. Local de estudo

O local de estudo, fica situado na região Centro, freguesia e concelho de Tábua, distrito de Coimbra (40°21'N, 7°59'O). É caracterizado essencialmente pela presença de carvalhos (*Quercus robur*), medronheiros (*Arbutus unedo*) e exemplares jovens de pinheiro-bavo (*Pinus pinaster*).

Há cerca de cinco anos, os pinheiros existentes no local secaram devido à presença do nemátode-do-pinheiro (*Bursaphelenchus xylophilus*) e foram cortados. Actualmente observa-se a regeneração natural de *P. pinaster*.

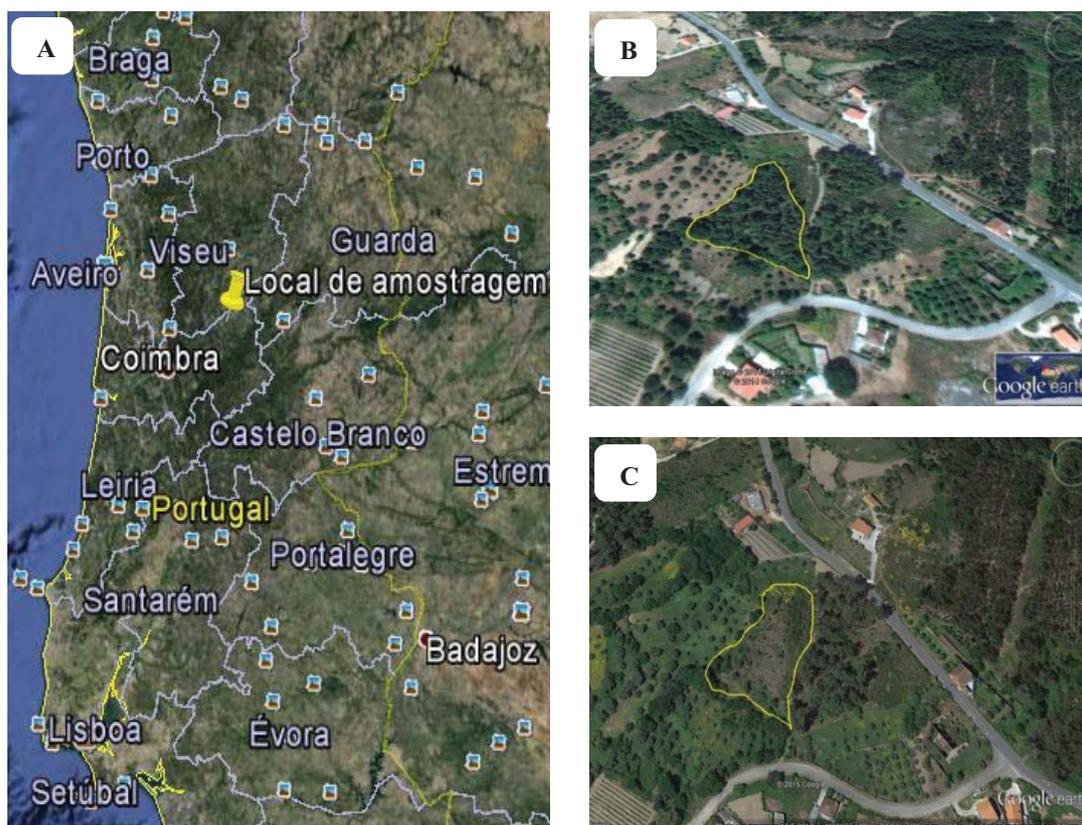


Figura 6. Local de estudo. (A) Localização da zona de estudo no mapa de Portugal. (B) Vista do local delimitado no ano 2010. (C) Vista do local delimitado no ano 2015, após o corte de *P. pinaster*. Fonte: Google Earth.

1.2.2. Amostragem de corpos frutíferos

Para a amostragem de corpos frutíferos, foram estabelecidos 3 transeptos fixos de comprimento de 45 m e 5 m de largura, espaçados entre si 10 m com orientação W-E (Figura 7), que foram percorridos semanalmente durante a principal estação de frutificação (Outono/Inverno) e quinzenalmente o resto do ano. A amostragem teve início em Agosto de 2014 e terminou em Junho de 2015. Foram colhidos exemplares de todas as espécies encontradas, de forma a proceder-se à sua identificação com o auxílio de guias de campo, chaves e monografias, tendo por base características macro e microscópicas dos carpóforos.

O processo de colheita envolveu especial cuidado, tendo sido colhidos exemplares em bom estado de conservação e, quando possível, em diferentes estados de desenvolvimento. Os espécimes foram removidos do substrato escavando à volta da base do pé de forma a não o danificar e garantir que estruturas especiais, a existirem, por exemplo volva não eram perdidas, uma vez que são essenciais para a identificação do espécime. No momento da colheita foram registadas características efémeras, tais como cheiro/odor, paladar, cor e textura do exemplar e reacção ao corte. Na descrição do habitat registou-se o substrato colonizado (solo, folhada, madeira) e o hábito dos carpóforos (solitário, gregário). O trabalho de campo foi acompanhado pelo registo fotográfico dos exemplares e pelo registo em folhas de campo, que contemplavam todas as características dos carpóforos (com esquemas representativos) com uma sequência lógica, segundo a metodologia proposta por Mueller, (2004). Os espécimes foram acondicionados individualmente, numerados e mantidos a baixa temperatura durante o transporte para o laboratório, onde se procedeu à obtenção da esporada. Com o auxílio das folhas de campo e guias de identificação (e.g. Gerhardt *et al.*, 2000) procedeu-se à identificação dos exemplares (quando identificado apenas o género os exemplares são designados por morfoespécies). Posteriormente, os carpóforos foram desidratados numa estufa ventilada a 30°C. Já secos os espécimes foram guardados individualmente e devidamente etiquetados (identificação do exemplar, data da colecta, colector e local de amostragem), constituindo exemplares testemunho de herbário.

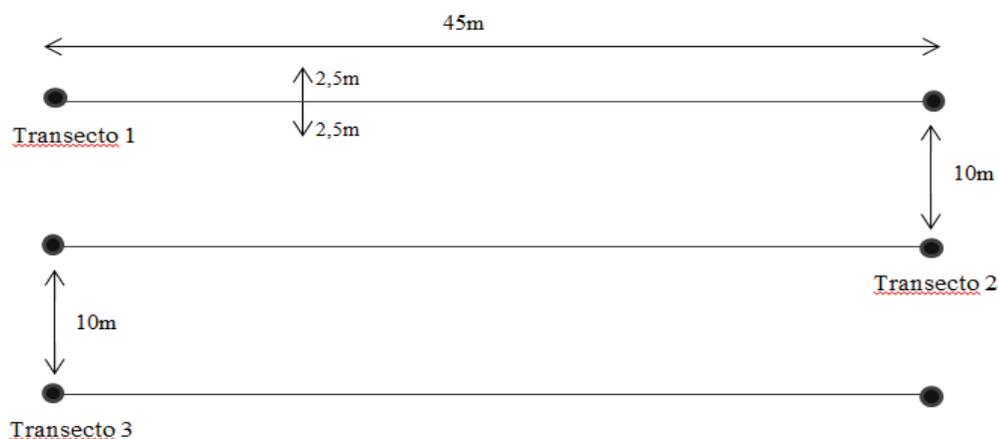


Figura 7. Representação esquemática (sem escala) do desenho experimental utilizado.

1.2.3. Amostragem de solo e processamento de raízes

Foram amostrados, 10 medronheiros de porte arbustivo (com alturas compreendidas entre 1,40 m e 3 m) e 10 pinheiros (com alturas compreendidas entre os 0,60 m e 0,75 m). Os medronheiros foram amostrados em duas estações consecutivas (Outubro - Novembro 2014 e Março 2015) e os pinheiros apenas em Março de 2015.

Inicialmente o procedimento adotado para a colheita de raízes consistiu na amostragem de cada indivíduo: distâncias de cerca de 40 cm do tronco e profundidade 15 cm (valores aproximados, variando conforme o porte de cada indivíduo), foram retiradas quatro amostras de solo segundo os quatro pontos cardiais (para aumentar a probabilidade de colher micorrizas). As quatro amostras de cada indivíduo foram homogeneizadas numa amostra compósita. No entanto, após a observação das primeiras amostras colhidas com este método foi decidido adoptar um procedimento diferente. O novo procedimento consistiu na procura das raízes principais do indivíduo e posteriormente nas raízes secundárias e jovens. Embora mais moroso em campo, este processo garantiu material jovem e a maior certeza acerca da identidade da espécie vegetal amostrada.

O trabalho prosseguiu no laboratório com o processamento das raízes: lavagem - para remoção das partículas do solo e análise das amostras para separação dos diferentes tipos morfológicos de micorrizas, designados morfotipos.

De acordo com a metodologia de Ingleby e colaboradores (1990), a separação foi feita com base na forma, ramificação, cor e textura das micorrizas (Figura 8). As pontas micorrizadas foram guardadas em eppendorfs com tampão CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide), devidamente etiquetados.



Figura 8. Diferentes morfotipos de micorrizas observados à lupa. A-H hospedeiro *A. unedo*, com ampliações (A) 35X; (B) 30X; (C) 20X; (D) 35X; (E) 30X; (F) 25X; (G) 20X; (H) 16X. I-L hospedeiro *P. pinaster*, com ampliação 30X:

1.2.4. Identificação molecular de fungos micorrízicos

Para identificação molecular, as micorrizas previamente isoladas foram retiradas do tampão CTAB e transferidas para microtubos, para dar início ao processo de extracção de DNA utilizando o REDEExtract-N-Amp Plant PCR Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Brevemente, o protocolo consistiu na adição de 15µl da solução de extracção, aquecimento a 65°C durante 10 min seguido de aquecimento a 95°C durante 15 min, com adição de 15µl da solução de diluição no final.

A reacção de PCR para amplificação da região ITS foi realizada utilizando os *primers* ITS1 e ITS4 (para asco- e basidiomicetes; Gardes & Bruns, 1993), “master mix” de PCR (NZYTaQ Master Mix) preparada em água ultrapura autoclavada, com a amostra de DNA. A amplificação foi conduzida num termociclador (Applied Biosystems GeneAmp 9700). O volume de DNA utilizado assim como os programas de PCR (como sejam a temperatura de “annealing” e o número de ciclos) foram adaptados às diferentes amostras. Assim, o volume de DNA utilizado variou entre 1 e 4µl, as temperaturas de “annealing” entre 53°C e 55°C, e o número de ciclos entre 25 e 35.

Os produtos das extracções de DNA e das reacções de PCR foram visualizados através de electroforese em gel de agarose (0.5 e 1%, respectivamente) corado com 2 µl de *Green Safe* (NZYtech, Lisboa, Portugal), visualizado com luz UV e fotografado. No caso dos produtos de PCR, foi utilizado 1 µl do marcador NZYDNA Ladder V (100 lanes). Os produtos de amplificação foram encaminhados para a empresa STAB VIDA (Lisboa, Portugal), para purificação e sequenciação. As sequências foram obtidas inicialmente num sentido, sendo sequenciado o sentido inverso quando necessário.

Os eletroferogramas foram analisados visualmente e editados manualmente utilizando o software Geneious 8.1.4. Após a edição, cada sequência obtida foi utilizada para busca das mais similares depositadas no GenBank, e UNITE, utilizando a ferramenta BLASTn. Para a identificação dos *taxa* fúngicos utilizaram-se os seguintes critérios:

97-100% similaridade numa ou noutra base de dados – a identificação foi feita de acordo com o resultado mais informativo (espécie ou género).

<97% similaridade em ambas as bases de dados – a identificação fez-se pelo nível taxonómico mais baixo partilhado entre ambas as bases de dados (família, ordem ou classe).

Classificações ambíguas foram resolvidas através do alinhamento com sequências de referência (UNITE) e respectiva análise filogenética.



Figura 9. Esquema sequencial da metodologia utilizada na avaliação da comunidade de fungos micorrízicos associados às raízes de medronheiro e de ninheiro.

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada através um “test-t (Programa GraphPad Prism 6), sendo considerado que para haver diferenças significativas, $p < 0,05$.

1.3. Resultados e Discussão

1.3.1. Corpos frutíferos

No local de estudo, e no período em apreço, foram identificadas 45 espécies de macrofungos (Figura 10). Estas espécies encontram-se distribuídas por 27 géneros, sendo os mais representados *Clitocybe*, *Cortinarius* e *Inocybe*, com 4 espécies cada.

O gráfico da Figura 11 representa o número de espécies encontradas por saída ao longo do tempo de amostragem (período de Agosto 2014 a Junho 2015). A época de maior frutificação ocorreu no Outono (Figura 12), altura em que o número máximo de carpóforos

encontrado numa só saída foi de 11 espécies. Relativamente aos restantes meses de amostragem, surgem algumas espécies em Outubro de 2014 e Janeiro de 2015. Quanto aos grupos funcionais, há dominância, embora muito ténue, dos macrofungos micorrízicos que perfazem 51% do total de espécies encontradas (Figura 13).



Figura 10. Carpóforos em campo. (A) *Russula fragilis*; (B) *Laccaria amethystina*; (C) *Lactarius deliciosus*; (D) *Hebeloma*; (E) *Suillus*; (F) *Lycoperdon perlatum*.

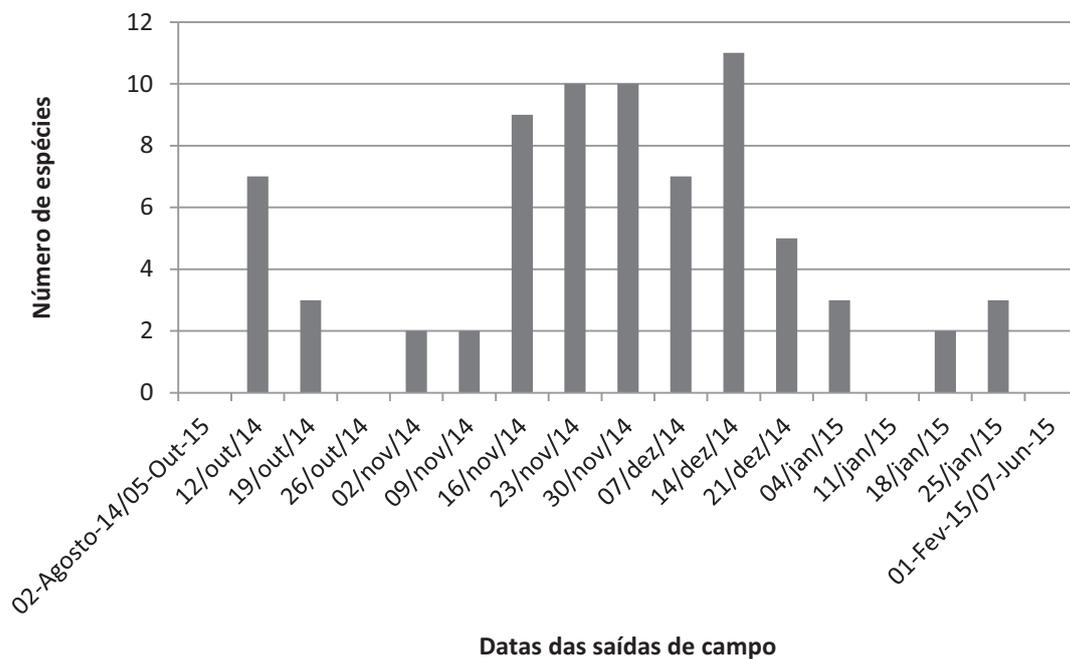


Figura 11. Número de espécies amostradas no local de estudo ao longo das várias saídas de campo.

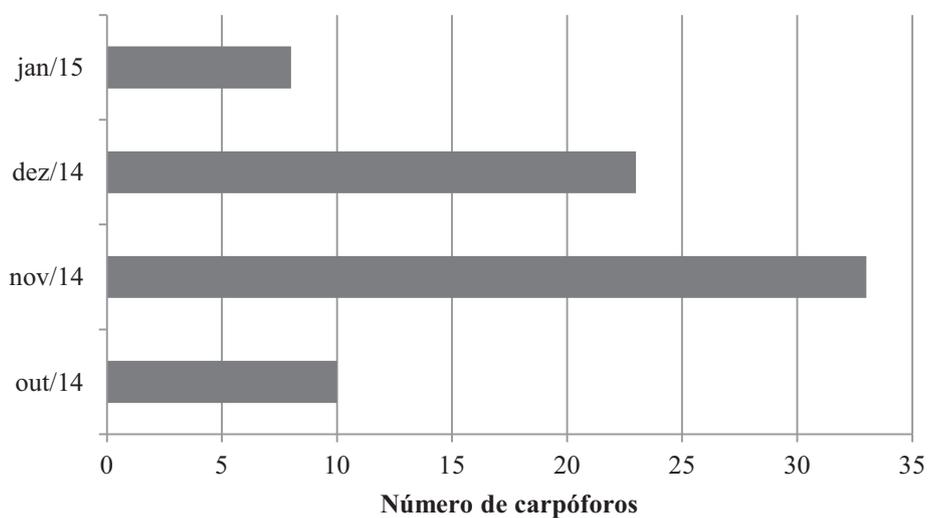


Figura 12. Número de carpóforos colectados nos diferentes meses de amostragem.

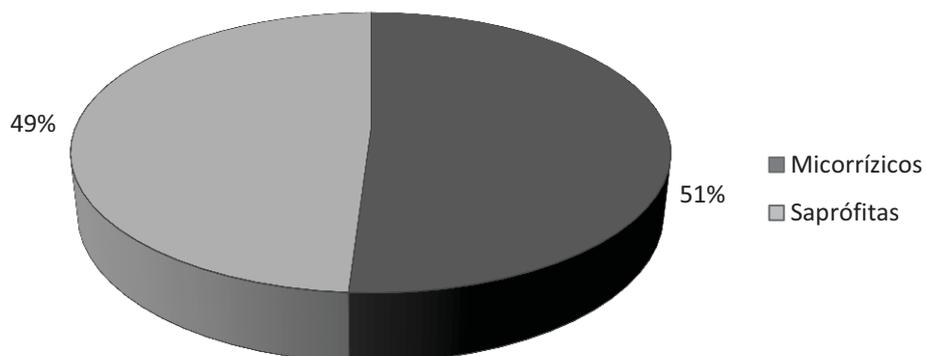


Figura 13. Distribuição das espécies amostradas no local de estudo pelos 2 grupos funcionais: micorrízicos e saprófitas.

A Tabela 2 resume a ocorrência do número de espécies dos diferentes gêneros no decorrer das saídas. Os gêneros que apresentaram maior ocorrência foram *Laccaria*, *Cortinarius* e *Leotia*. Também aqui é notório que a maioria dos gêneros foi encontrada no mês de Novembro.

Tabela 2. Número de espécies, por gênero, registradas ao longo das saídas de campo. São referidos o número de ocorrência dos gêneros e o número de gêneros por saída.

Gêneros	Datas das saídas																Número de ocorrências dos gêneros
	02.08.14-	12.10.14	10.10.14	26.10.14	02.11.14	09.11.14	22.11.14	29.11.14	07.12.14	14.12.14	21.12.14	04.01.15	11.01.15	18.01.15	25.01.15	01.02.15-	
<i>Clathrus</i>		1	1	1													3
<i>Clitocybe</i>		1					1		1		1						4
<i>Collybia</i>								2	1	1							3
<i>Conocybe</i>							1										1
<i>Cortinarius</i>							1	1	1	1	1	2					6
<i>Entoloma</i>							2										1
<i>Galerina</i>										1							1
<i>Geoglossum</i>							1										1
<i>Gymnopilus</i>									1								1
<i>Hebeloma</i>							1										1
<i>Hydnum</i>											1	1		1	1		4
<i>Hypholoma</i>							1										1
<i>Inocybe</i>							1	2		1							3
<i>Laccaria</i>			1			1	2		2		2	1	2			1	8
<i>Lactarius</i>							1		1								2
<i>Leotia</i>								1			1	1		1	1		5
<i>Lepiota</i>							1										1
<i>Lycoperdon</i>							2			1							2
<i>Macrolepiota</i>							1										1

<i>Mycena</i>		2	1															2
<i>Paxillus</i>									1									1
<i>Psathyrella</i>								1										1
<i>Russula</i>		1	1							1								3
<i>Scleroderma</i>					1													1
<i>Suillus</i>		1			1					1								3
<i>Tricholoma</i>						1	1		1		1							4
<i>Xerocomus</i>		1																1
Nº de géneros por saída	0	6	4	1	2	2	6	10	7	7	8	4	3	0	2	3	0	

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que os meses de Novembro e Dezembro foram os mais adequados à frutificação, o que vai de acordo com estudos anteriores (Baptista *et al.*, 2010). Embora a classificação das espécies macrofúngicas em grupos funcionais nem sempre seja clara, é bastante útil para se ter uma percepção da comunidade, uma vez que os fungos micorrízicos são apontados como bons indicadores de ausência de poluição (Branco, 2003). Neste caso, os fungos micorrízicos representaram apenas 51% do total de espécies amostradas (Figura 13).

Os resultados reportam-se a um ano de amostragem apenas e são, por isso, necessariamente preliminares – pressupõe-se que o número de espécies existentes no local seja incomparavelmente superior à lista aqui apresentada (Branco, 2003; Baptista *et al.*, 2010). Para além disso, em 69% dos casos não foi possível a identificação até à espécie porque maioritariamente foi encontrado um único exemplar de cada morfoespécie. No entanto, apesar destas limitações, esta abordagem permitiu conhecer parte da comunidade de macrofungos associada à floresta caracterizada essencialmente pela existência de *A. unedo*, *Q. robur* e *P. pinaster*.

1.3.2. Morfotipos

A amostragem de cada medronheiro ($n=10$) ocorreu em duas estações de crescimento consecutivas, Outono de 2014 e Primavera de 2015. A diferença quanto ao número de morfotipos amostrados de raízes colonizadas nas diferentes estações do ano não se mostrou significativa ($P>0,05$), embora o maior número de morfotipos encontrados por indivíduo tenha sido no Outono (Figura 14).

Entre medronheiros e pinheiros foram encontradas diferenças significativas ($P<0,05$) na média do número de morfotipos por indivíduo: $3,1 \pm 0,3$ em *A. unedo* significativamente maior que o número de morfotipos por indivíduos em *P. pinaster* ($1,7 \pm 0,3$; Figura 15). Em associação com o medronheiro, foram identificados cerca de nove morfotipos diferentes (com base na cor, morfologia e textura) e no pinheiro cerca de seis morfotipos diferentes, separados segundo os meus critérios (Ingleby *et al.*, 1990).

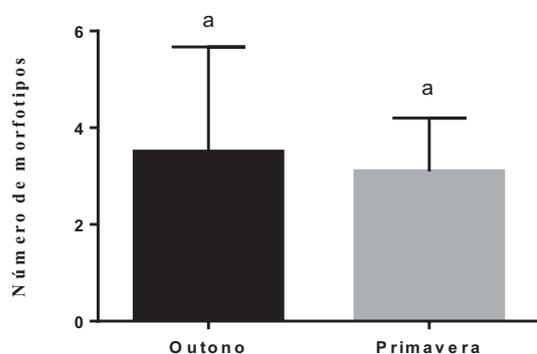


Figura 14. Média do número de morfotipos/indivíduo amostrados no medronheiro em duas estações de crescimento consecutivas (Outono 2014 e Primavera 2015). Os valores com letras iguais não são significativamente diferentes.

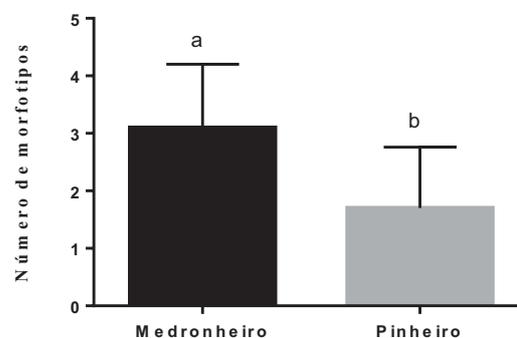


Figura 15. Média do número de morfotipos/indivíduo amostrados no medronheiro e pinheiro-bravo (Primavera 2015). Os valores com diferentes letras são significativamente diferentes.

1.3.3. Identificação molecular dos fungos nas micorrizas

Após as duas épocas de amostragem consecutivas, foram identificados no total dezasseis *taxa*. A análise filogenética (Figura 16) mostra que 12 *taxa* pertencem ao filo Basidiomycota e 4 ao filo Ascomycota. Tanto em *A. unedo* como em *P. pinaster*, a comunidade de fungos foi dominada por espécies pertencentes ao filo Basidiomycota o que vai de acordo com estudos de Buscardo e colaboradores (2011).

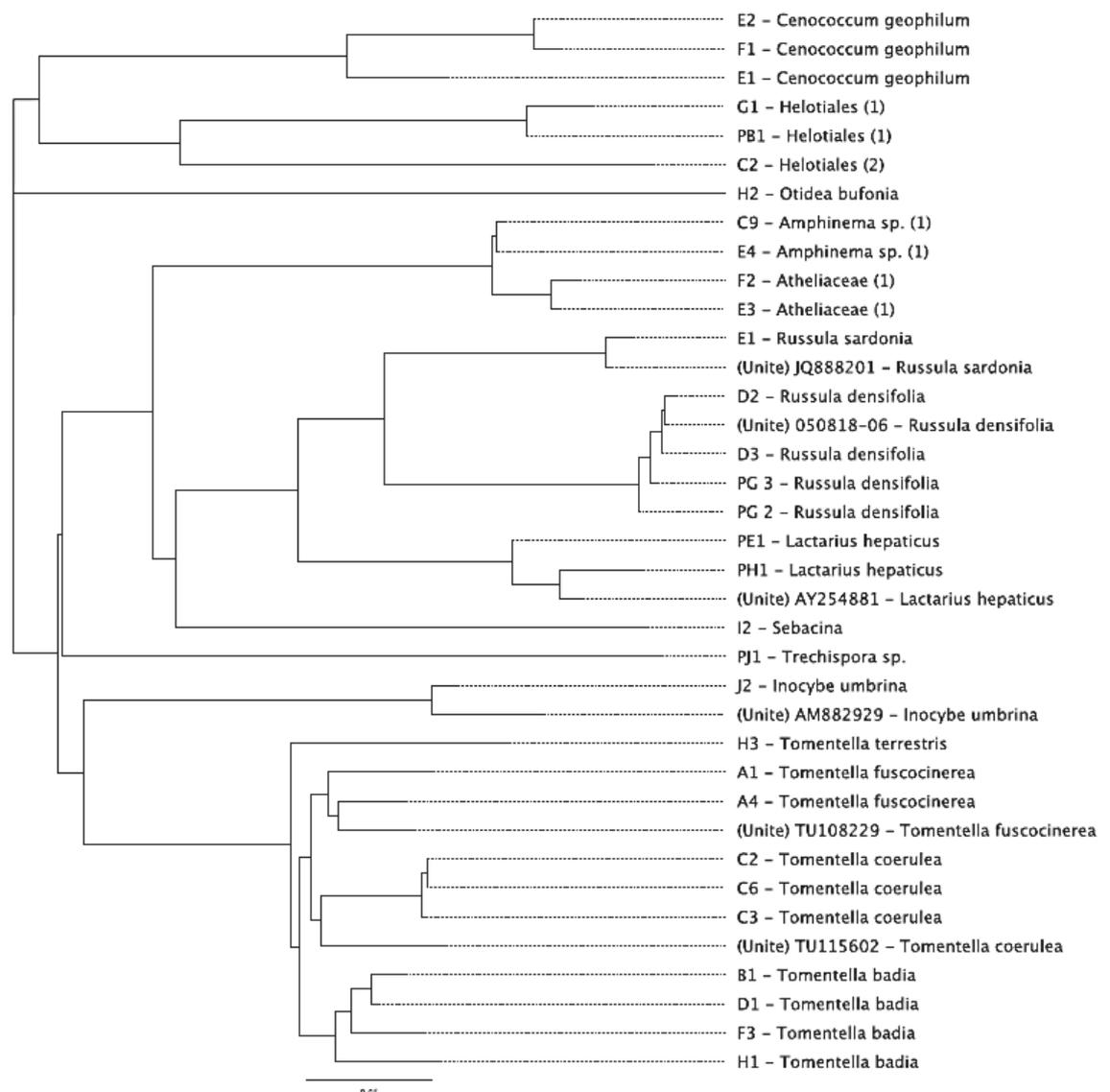


Figura 16. Relação filogenética de 16 taxa - fungos micorrizos associados a *A. unedo* e *P. pinaster* - com base na sequenciação da região ITS. As sequências foram obtidas a partir das bases de dados GenBank e UNITE.

Do total de *taxa* amostrados, 12 existem em associação exclusiva com o medronheiro e 2 com o pinheiro (Figura 17). Os *taxa Helotiales sp.1* e *Russula densifolia* aparecem associados a ambos os hospedeiros, mostrando haver partilha de fungos micorrízicos comuns entre *A. unedo* e *P. pinaster*.

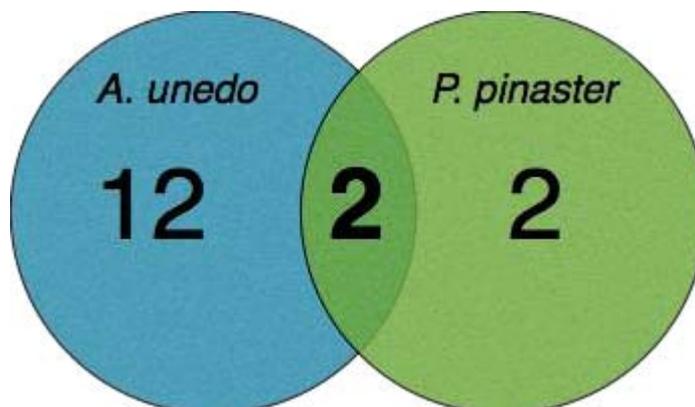


Figura 17. Taxa associados a *Arbutus unedo* e *Pinus pinaster*. Representação dos taxa exclusivamente associados ao medronheiro (a cor azul) e ao pinheiro-bravo (a cor verde), e os taxa partilhados por ambas as espécies hospedeiras.

A frequência foi avaliada segundo o número de ocorrências de um taxa na população de *A. unedo* e de *P. pinaster*. A espécie fúngica *Tomentella badia* foi a que mais vezes apareceu associada ao medronheiro, (em 4 indivíduos), seguida de *C. geophilum*, *Amphinema sp.1* e *Atheliaceae sp.2*, que apareceram em 2 indivíduos (Figura 18). Em relação ao pinheiro, a espécie *Lactarius hepaticus* surgiu em 2 indivíduos, mostrando ser a mais frequente, embora estudos já realizados (Buscardo *et al.*, 2011) refiram a *Russula densifolia* como uma das espécies com maior frequência.

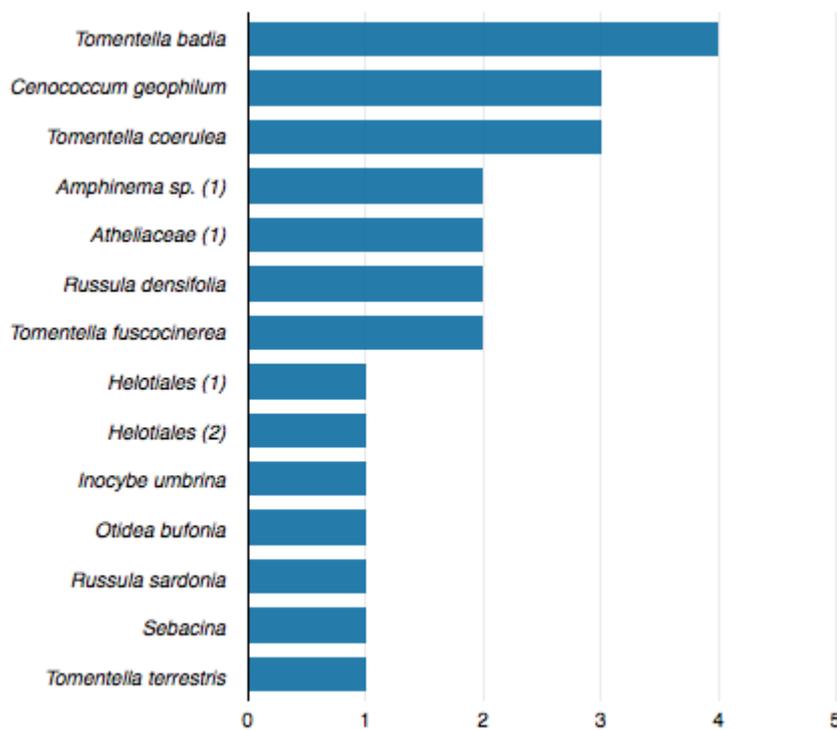


Figura 18. Frequência de espécies isoladas, associadas a *A. unedo*

No gráfico da Figura 19, está representado o número de *taxa* associados a cada hospedeiro vegetal. Permitem ter a percepção de que à medida que os indivíduos vão sendo amostrados, o número de diversidade de espécies fúngicas vai tendo tendência a estabilizar.

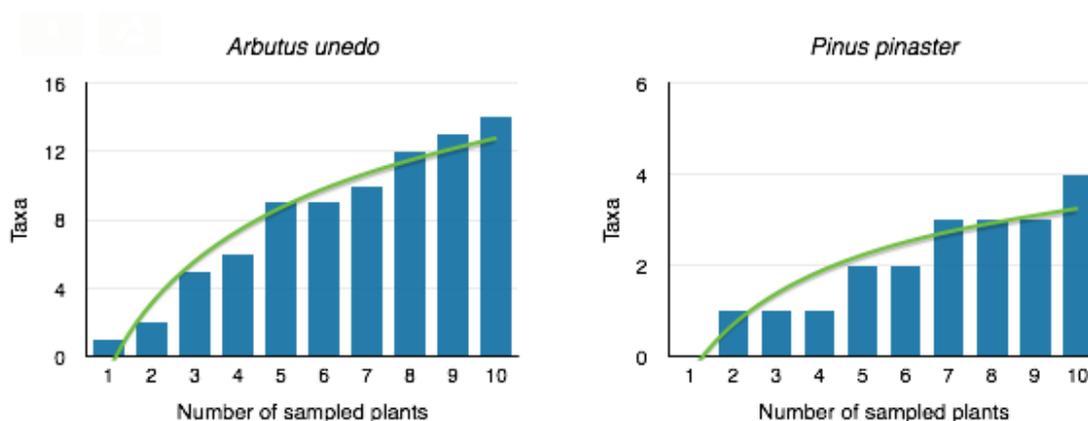


Figura 19. Curvas de acumulação dos *taxa* fúngicos com base nos dados da sequenciação da região ITS.

Algumas dificuldades metodológicas podem ajudar a explicar os resultados obtidos. Por exemplo, de um total de 82 amostras das quais foi extraído DNA, apenas foi possível obter bons produtos de PCR em 31 amostras. Isto poderá ser explicado, por uma quantidade de DNA desadequada (demasiado concentrada ou diluída). De facto, a natureza do material – pouco (nalguns casos um morfotipo era representado apenas por uma ponta micorrizada) e muito heterogéneo (muitos morfotipos) terá com certeza influenciado o correcto funcionamento da PCR. Por outro lado, apesar de as raízes se terem mantido em tampão CTAB no frigorífico e o tempo entre a colheita e o isolamento de morfotipos nunca ter ultrapassado 3 dias, é possível que tenha ocorrido degradação do DNA de algumas amostras, o que pode comprometer a amplificação (Horton & Bruns, 2001).

Embora algumas espécies apresentem correspondência bastante consistente entre a frutificação e a presença abaixo do solo, nas micorrizas, como regra geral, a diversidade de carpóforos não reflecte adequadamente a diversidade de fungos ECM (Baptista *et al.*, 2010). Em parte, esta divergência pode ser explicada pela duração do tempo de frutificação (curto em algumas espécies), pela ausência de corpo frutífero (e.g. *C. geophilum*) ou pela existência de corpos frutíferos que passam despercebidos (e.g. *Tomentella*). Exemplificando, estes dados estão de acordo com os resultados

obtidos uma vez que o género *Tomentella* foi o mais frequente associado ao medronheiro, no entanto não apresentou correspondência na observação de corpos frutíferos.

Quanto à hipótese do potencial para a formação de redes de micélio comuns entre *A. unedo* e *P. pinaster*, os resultados não foram muito conclusivos. Existem estudos (Richard *et al.*, 2005; Richard *et al.*, 2009) que demonstram a partilha de fungos micorrízicos entre *A. unedo* e *Quercus ilex*. Estudos de Kennedy e colaboradores (2012) referem que há partilha de fungos micorrízicos entre *A. menziesii* e Pinaceae e que comunidades de fungos micorrízicos são similares. Embora não se tratem das espécies em estudo, tratam-se do mesmo género e família podendo haver alguma relação nos resultados obtidos. No estudo acima mencionado (Kennedy *et al.*, 2012), os resultados obtidos estão relacionados de forma positiva com os deste estudo, uma vez que também se observou um maior número de espécies associada ao género *Arbutus* do que à família Pinaceae. Seria de esperar que a comunidade de pinheiros, para o seu estabelecimento, poderia tirar partido das redes de micélio comuns com o medronheiro, mas, no entanto seriam necessários mais resultados para consolidar esta informação.

1.4. Bibliografia

Baptista, P., Martins, A., Tavares, R.M., Lino-Neto, T. (2010). Diversity and fruiting pattern of macrofungi associated with chestnut (*Castanea sativa*) in the Tra's-os-Montes region (Northeast Portugal). *Fungal Ecology*, 3(1), 9-19.

Branco, S.M. (2003). Macrofungos no Parque Natural de Montesinho-Estudo preliminar de inventariação e caracterização. *Bragança, Instituto de Conservação da Natureza. Documento interno.*

Buscardo, E., Freitas, H., Pereira, J.S., Angelis, S. (2011). Common environmental factors explain both ectomycorrhizal species diversity and pine regeneration variability in a post-fire Mediterranean forest. *Mycorrhiza*, 21(6), 549-558.

Buscardo, E., Rodríguez-Echeverría, S., Barrico, L., García, M. Á., Freitas, H., Martín, M. P. & Muller, L. A. (2012). Is the potential for the formation of common mycorrhizal networks influenced by fire frequency?. *Soil Biology and Biochemistry*, 46, 136-144.

Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology*, 2(2), 113-118.

Gerhardt, E., Vila, J. & Llimona, X. (2000). Hongos de España y de Europa. Omega SA, Barcelona.

Gomes, F., Machado, H., San Martin, E., Portugal, A., & Canhoto, J. M. (2013). Mycorrhizal synthesis between *Pisolithus arhizus* and adult clones of *Arbutus unedo* *in vitro* and *in nursery*. *Journal of forestry research*, 24(4), 659-670.

Horton, T. R., & Bruns, T. D. (2001). The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular ecology*, 10(8), 1855-1871.

Ingleby, K., Mason, P. A., Last, F. T., & Fleming, L. V. (1990). Identification of ectomycorrhizas. ITE research publication no. 5. Institute of Terrestrial Ecology.

Kennedy, P. G., Smith, D. P., Horton, T. R., & Molina, R. J. (2012). *Arbutus menziesii* (Ericaceae) facilitates regeneration dynamics in mixed evergreen forests by promoting mycorrhizal fungal diversity and host connectivity. *American journal of botany*, 99(10), 1691-1701.

Moreno-Jiménez, E., Penalosa, J. M., Carpena-Ruiz, R. O., & Esteban, E. (2008). Comparison of arsenic resistance in Mediterranean woody shrubs used in restoration activities. *Chemosphere* 71(3), 466-473.

Mueller, G.M., Bills, G.F., Foster, M.S. *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Elsevier Acad. Press, 2004.

Richard, T., Millot, S., Gardes, M., Selosse, M-A. (2005). Diversity and specificity of ectomycorrhizal fungi retrieved from an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex*. *New Phytologist* 166: 1011–1023.

Richard, F., Selosse, M-A. & Gardes, M. (2009). Facilitated establishment of *Quercus ilex* in shrub-dominated communities within a Mediterranean ecosystem: do mycorrhizal partners matter?. *Microbiol Ecol* 68 (2009) 14–24.

Tujeira, R., Morgado, R. (2007). Resposta de diferentes espécies florestais ao fogo- Um estudo de caso relativo aos incêndios de 2006 na região de Porto-de-Mós/Tomar. Relatório técnico no âmbito do projecto “Recuperação de Áreas Ardidas”. Centro de Ecologia Aplicada “Prof. Baeta Neves”, Instituto Superior de Agronomia.

Protocolo de micorrização controlada entre *A. unedo* e
C. geophilum

2.1. Introdução

A existência de métodos eficazes de propagação é essencial quando se pretende melhorar uma espécie. A propagação pode ser feita através de métodos convencionais, no entanto apresentam algumas limitações como por exemplo baixas taxas de enraizamento ou de germinação de sementes (Canhoto, 2010). De forma a contornar estas limitações, as técnicas de micropropagação *in vitro* surgem como uma alternativa eficaz em relação aos métodos convencionais (Canhoto, 2010; Gomes, 2011). As técnicas de cultura *in vitro* tornam-se vantajosas uma vez que é necessária uma pequena quantidade de material para obter vários indivíduos, a produção é uniforme ao longo do ano e o processo é realizado em condições assépticas e controladas (Gomes, 2011); como desvantagens são necessárias instalações adequadas e obra de mão qualificada. Algumas técnicas de micropropagação, como a embriogénese somática, organogénese e proliferação de meristemas axilares, foram já aplicadas na propagação *in vitro* de plantas lenhosas, sendo esta última técnica a mais usada na propagação de Ericáceas (Gomes & Canhoto, 2009).

A inoculação controlada com fungos micorrízicos tem vindo a ser explorada como ferramenta útil para obtenção de indivíduos mais tolerantes a diversos tipos de stress, facilitando, por exemplo, a aclimação das plantas micropropagadas (Gomes, 2011). Em termos práticos, a importância deste tipo de associações simbióticas prende-se essencialmente com a redução da aplicação de fertilizantes e biocidas - prática que poderá reduzir a poluição ambiental- e com o estabelecimento das plantas em campo. Em estudos de Gomes e colaboradores (2013) foi possível a micorrização de clones seleccionados de *A. unedo* com o fungo *Pisolithus arhizus*. No entanto, algum tempo após a transferência das plantas para o campo, o fungo inoculado tinha sido substituído por fungos micorrízicos autóctones, entre os quais *Cenococcum geophilum*. Tendo em conta o crescente interesse no medronheiro (ver introdução geral) e a sua associação em condições naturais com *C. geophilum* (Trappe, 1964) a obtenção de um protocolo de micorrização controlada torna-se interessante.

2.2. Materiais e Métodos

2.2.1. Propagação *in vitro* de *Arbutus unedo*

Material vegetal

No presente trabalho, foram utilizadas plântulas de medronheiro do clone C1, previamente estabelecidas *in vitro* no Laboratório de Biotecnologia Vegetal (Departamento de Ciências da Vida, FCTUC). Este clone com origem geográfica na zona de Coimbra foi obtido a partir de uma planta que regenerou pós- fogo.

Cultura *in vitro*

Para a micropropagação do medronheiro (Figura 20), foi utilizado o meio de Fossard (De Fossard *et al.*, 1974) modificado, constituído por macronutrientes e vitaminas de Fossard, micronutrientes MS (Murashige & Skoog, 1962), ferro (Fe.EDTA; 5 ml/l), sacarose 3% e um regulador de crescimento BAP (Benzilaminopurina) (2 mg/l). Para a preparação do meio de cultura, cada componente foi pipetado a partir de soluções stock, e após a adição da sacarose, ajustou-se o volume total da solução com água destilada. O pH foi ajustado a 5,7 com soluções stock de HCl e/ou NaOH, e posteriormente adicionado agar, um agente gelificante (6 g/l) (Panreac). Por fim, a solução foi aquecida de forma a dissolver o ágar e distribuída por frascos (cerca de 25 ml em cada). A esterilização foi efectuada, na autoclavar a 121°C durante 20 minutos.

Foram colocados 5 explantes (fitómeros) do clone C1, em cada frasco. O material foi mantido numa câmara a 25°C com fotoperíodo de 16h de luz e 70% de humidade, durante 2 meses. Após esse período, procedeu-se ao enraizamento que envolveu uma fase de indução e uma fase de alongamento das raízes. Na primeira, as plantas foram transferidas para tubos de ensaio com meio constituído por macronutrientes Knop (Gautheret, 1959), micronutrientes de MS com excepção de iodeto de potássio (KI), vitaminas de Fossard com excepção da riboflavina, ferro de MS (Fe.EDTA; 5ml/l), sacarose 1,5% (Duchef) e a auxina IBA (5 mg/l) e mantidas 8 dias em condições de obscuridade a 25°C. Na fase de alongamento, as plantas foram transferidas para meio com

a composição anteriormente mencionada mas com as seguintes alterações: sacarose 3 %, carvão 1,5% (p/v) (Merck) e sem adição de IBA.

No fim do período de indução e de alongamento das raízes, as plantas foram transferidas para recipientes com substrato, constituído por uma mistura de turfa e perlite (1:1) humedecido com meio líquido de Fries (Fries 1978).



Figura 20. Esquema geral do procedimento realizado na micropropagação de *A. unedo*. (A1) Plântulas em meio de cultura após repicagem. (A2) Plântulas com 2 meses de crescimento. (B) Plântulas em meio de indução de enraizamento. (C) Plântulas em meio de alongamento das raízes.

2.2.2. *Cenococcum geophilum*

Material fúngico

Os isolados fúngicos de *C. geophilum* B49.1 e D44.1 foram obtidos a partir de esclerócios colhidos da rizosfera de *Quercus ilex* subsp. *ballota* no âmbito do projecto de

investigação CENECOGEN (PTDC/BIA-BEC/100733/2008). A selecção destes dois isolados baseou-se no facto de apresentarem crescimento notório maior, quando comparados aos outros isolados da colecção. Foram colocados - em competição um com um outro numa caixa de Petri (em “dual-culture”) e verificou-se que o isolado D44.1 apresentava crescimento mais rápido (S. Gonçalves, comunicação pessoal). Uma vez que esta espécie apresenta, em geral, crescimento lento, a observação referida justificou a escolha do isolado D44.1 para o presente ensaio.

As culturas axénicas do fungo micorrízico *C.geophilum*, são mantidas em meio PDA (Potato Dextrose Agar) (39 g/l) em sistema de sub-culturas sucessivas, existindo ainda uma cultura de referência preservada a -80°C.

Para o crescimento do fungo em meio líquido, foi utilizado o meio modificado de Fries (Fries 1978) contendo (mM):

- (a) D-glucose, 28; tartarato de amónio, $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4$, 5.4; KH_2PO_4 , 1.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.4; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2; NaCl, 0.3. Microelementos incluídos (μM): $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 4.0; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3.0; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 6.0; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.8; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.8; myo-inositol, 56; biotina, 0.1; piridoxina-HCl, 0.5; riboflavina, 0.3; nicotinamida, 0.8; ácido p-amino-benzóico (PABA), 0.7; tiamina-HCl, 0.3 e Ca-pantotenato.

2.2.3. Síntese micorrízica *in vitro*

Para induzir a micorrização de *A. unedo* por *C. geophilum* (Figura 21) foram testados dois tempos distintos de inoculação e dois tipos de recipientes: caixas de Petri (9 cm Ø) e frascos (V=200 ml).

O substrato utilizado para a síntese micorrízica foi uma mistura de turfa e perlite (1:1) esterilizada, posteriormente humedecida com 240 ml de meio líquido de Fries (a), glucose (2.8%) e pH ajustado a 5,5. O meio foi autoclavado durante 20 min a 121°C. As vitaminas e mio-inositol foram adicionadas ao meio por filtração (0,2 μm) antes da sua utilização. As caixas de Petri esterilizadas foram previamente furadas de forma a permitir a

passagem da planta para o exterior da mesma e de seguida, preenchidas com 60 ml de substrato esterilizado; esta operação foi realizada na câmara de fluxo laminar. Os frascos foram preenchidos com a mesma quantidade de substrato e levados a autoclavar (QU, Laiye *et al.*, 2003)

Foram realizados dois ensaios: 1) planta e fungo inoculados simultaneamente; 2) inoculação prévia do substrato. Em ambos os ensaios, o substrato foi humedecido com meio de Fries, adequado para o melhor desenvolvimento do fungo. Os inóculos fúngicos foram obtidos de culturas agarizadas do fungo em fase de crescimento activo do micélio (isolados com 4 meses após a repicagem; mantidos em estufa a $\pm 28^{\circ}$ C). Foram transferidos 3 “plugs” de micélio fúngico para cada recipiente com o micélio voltado para o substrato já humedecido.

No ensaio 1, o substrato foi humedecido com 12 ml meio de meio Fries e após a colocação dos “plugs”, o sistema radicular da planta foi colocado em contacto directo ou na proximidade do fungo. No ensaio 2, o substrato foi humedecido com 4,5 ml de meio Fries e após a inoculação, o fungo foi deixado a colonizar o substrato durante 4 semanas, findas as quais se procedeu à transferência de uma planta para cada frasco. Tanto as caixas de Petri como os frascos foram devidamente selados com Parafilm e com papel de alumínio, para evitar contaminações e para proteger as raízes da luz, respectivamente. As caixas de Petri foram mantidas na vertical (Figura 21 B) para o correcto crescimento da planta), no fitoclima com 16h de luz, 70% de humidade e a 25°C. Mensalmente foram adicionados cerca de 4,5 ml de meio Fries (Figura 21 D) em ambos os ensaios. Quatro meses após o início do ensaio, foi feito o levantamento. Foi analisado o sistema radicular (observação à lupa binocular) e as pontas micorrizadas isoladas para posterior impregnação em resina.

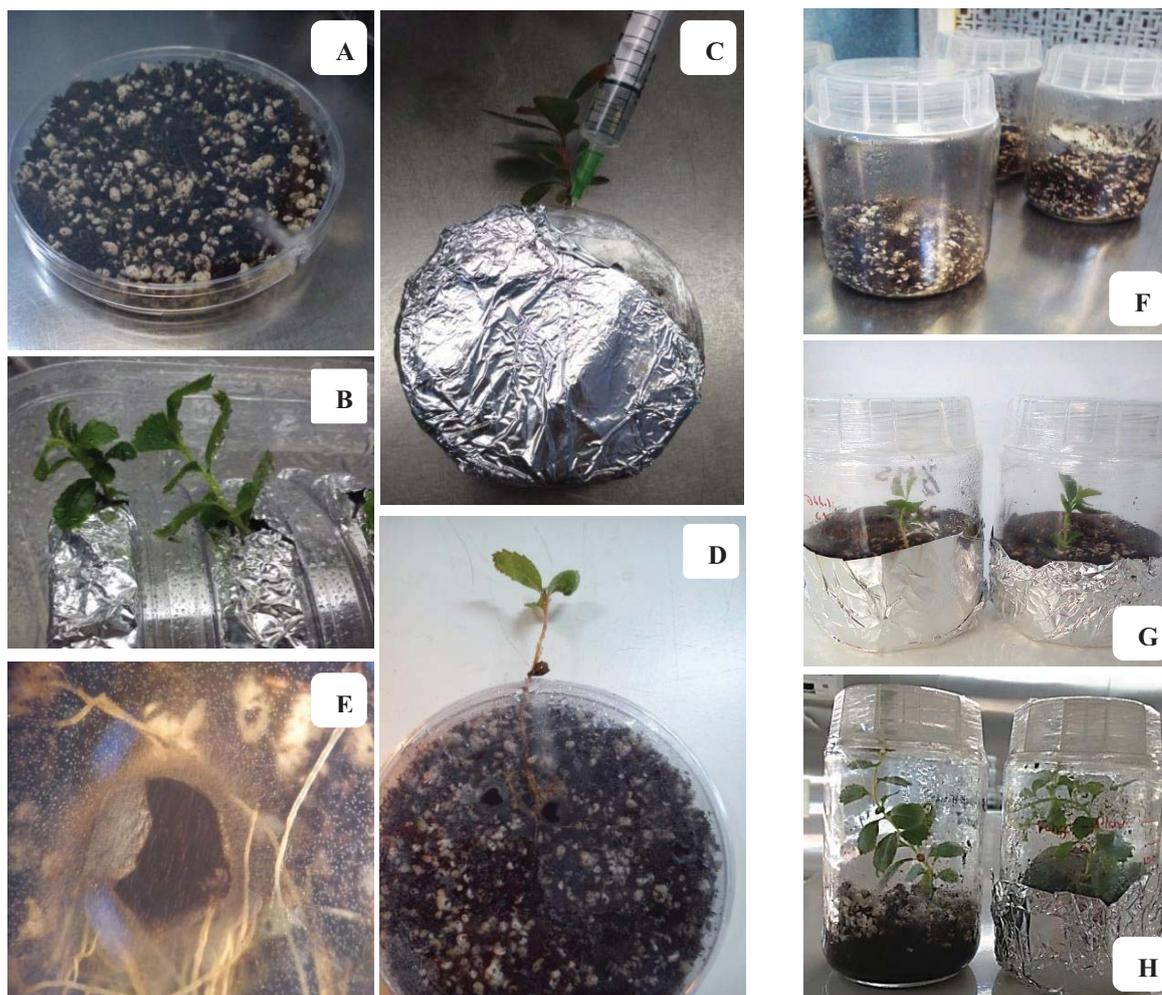


Figura 21. Ensaio de micorrização controlada *in vitro*. A a D -Ensaio em caixas de Petri. (A) Aspecto da caixa de Petri furada e com o substrato; (B) Plantas em substrato; (C) Adição de meio Fries; (D) Aspecto da planta em substrato com o sistema radicular em contacto com os “plugs”; (E) Colonização do substrato por *C. geophilum*. F a H- Ensaio em frascos. (F) Aspecto dos frascos com o substrato; (G) Plantas colocadas em substrato; (H) Plantas após 4 meses em substrato.

2.2.4. Caracterização anatômica das micorrizas

Para a caracterização anatômica, as micorrizas foram fixadas em glutaraldeído a 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0.1M, pH 7.2 durante 3 horas. O material foi posteriormente submetido a 3 lavagens de 15 minutos cada, no mesmo tampão. De seguida foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% preparado com o mesmo tampão durante 2 horas à temperatura ambiente. Após 3 lavagens de 15 minutos cada em água destilada, o

material foi desidratado em séries de etanol (70, 80, 90 e 100%) e depois impregnado com 3 soluções sucessivas de etanol 100% e resina, nas proporções 2:1, 1:1, 1:2, durante 2 horas cada. Por fim o material foi mantido em resina pura por uma noite e de seguida colocado em moldes, tendo permanecido em estufa a 70°C durante 24 horas. Com os blocos resultantes do processo anterior, foram feitos cortes semi-finos (1-2µm) com facas de vidro no micrómetro Ultrotome Nova. Os cortes foram colocados numa gota de água destilada sobre uma lâmina de vidro e deixados a secar. Posteriormente foram corados com uma solução de azul de toluidina 1% durante 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas com água destilada para retirar o excesso de corante. Os cortes foram observados e fotografados no microscópio Leica DM 4000 B usando o programa LAS v4.0.

2.3. Resultados e Discussão

2.3.1. Síntese micorrízica *in vitro*

Os resultados obtidos através do estabelecimento do protocolo mencionado, não foram tratados estatisticamente uma vez que o número de amostras ao ser muito pequeno, não permitiu o uso de testes estatísticos, de forma a relacionar e comparar os diferentes efeitos das variáveis na micorrização, sobrevivência e desenvolvimento das plantas. Neste contexto, a discussão dos resultados foi feita com base na importância do protocolo e nas perspectivas futuras que este possa ter.

.O ensaio de micorrização controlada teve como objectivo o estabelecimento de um protocolo que permitisse a obtenção de plantas de medronheiro micorrizadas com *C. geophilum*. Foram testadas duas variáveis: diferentes tipos de recipientes e diferentes tempos de contacto fungo-planta. (Tabela 3). Após quatro meses do levantamento do ensaio, concluiu-se que das 11 plantas que sobreviveram, 7 apresentaram raízes micorrizadas, sendo que a maioria destas, provém de frascos em que a inoculação ocorreu em simultâneo. Contrastando, plantas em caixas de Petri com tempo de inoculação sequencial, não revelaram presenças de micorrizas.

Tabela 3. Quadro resumo do ensaio de micorrização controlada in vitro.

Tipo de recipientes	Caixas de Petri		Fracos	
Substrato testado	Turfa + Perlite (1:1)		Turfa + Perlite (1:1)	
Tempo de contacto fungo-planta	Simultânea	Sequencial	Simultânea	Sequencial
n=	5	5	5	5
% Sobrevivência	40%	40%	80%	60%

Embora as plantas de medronheiro utilizadas no ensaio tenham sido micropropagadas a partir do mesmo clone, o desenvolvimento das mesmas foi diferente quando expostas às diferentes variáveis (tipo de recipientes e tempo de contacto). Através da análise de outros trabalhos da literatura, não foram encontradas referências de estudos iguais ao trabalho aqui realizado, embora existam semelhantes, que da mesma forma visam a obtenção de um protocolo de micorrização controlada, mas com espécies vegetais/fúngicas diferentes das aqui consideradas (Rincon *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2013; Grellier *et al.*, 1984; Guerin-Laguette *et al.*, 2000).

Uma das aplicações mais interessantes da síntese micorrízica, segundo Quinteiro (2005, citado por Gomes, 2011) é o incremento do desenvolvimento das plantas hospedeiras. Assim, os resultados obtidos por Gomes (2011) mostraram que plantas micorrizadas apresentam um crescimento superior sendo consistentes com a informação anterior, no entanto, noutros trabalhos não foi evidente um efeito positivo da micorrização (e.g. Rincon *et al.*, 2001), o que possivelmente pode ser explicado pelas condições do material vegetal e fúngico.

Embora os resultados não estejam suportados por estatística, é possível visualmente verificar que existiram diferenças no desenvolvimento das plantas, conforme o recipiente onde se encontravam. Desta forma, plantas que se desenvolveram nas caixas de Petri durante o período do ensaio, mostraram um melhor desenvolvimento da parte radicular, quando comparadas às plantas cujo desenvolvimento foi nos frascos (Figura 22). Do que

foi observado ao longo do trabalho, as maiores perdas de material vegetal ocorreram em caixas de Petri, independentemente da inoculação ter sido simultânea ou não, o que parece dever-se essencialmente à elevada percentagem de contaminações, que podem ter resultado da pequena abertura feita na caixa para que a parte aérea das plantas pudessem ficar de fora da caixa.

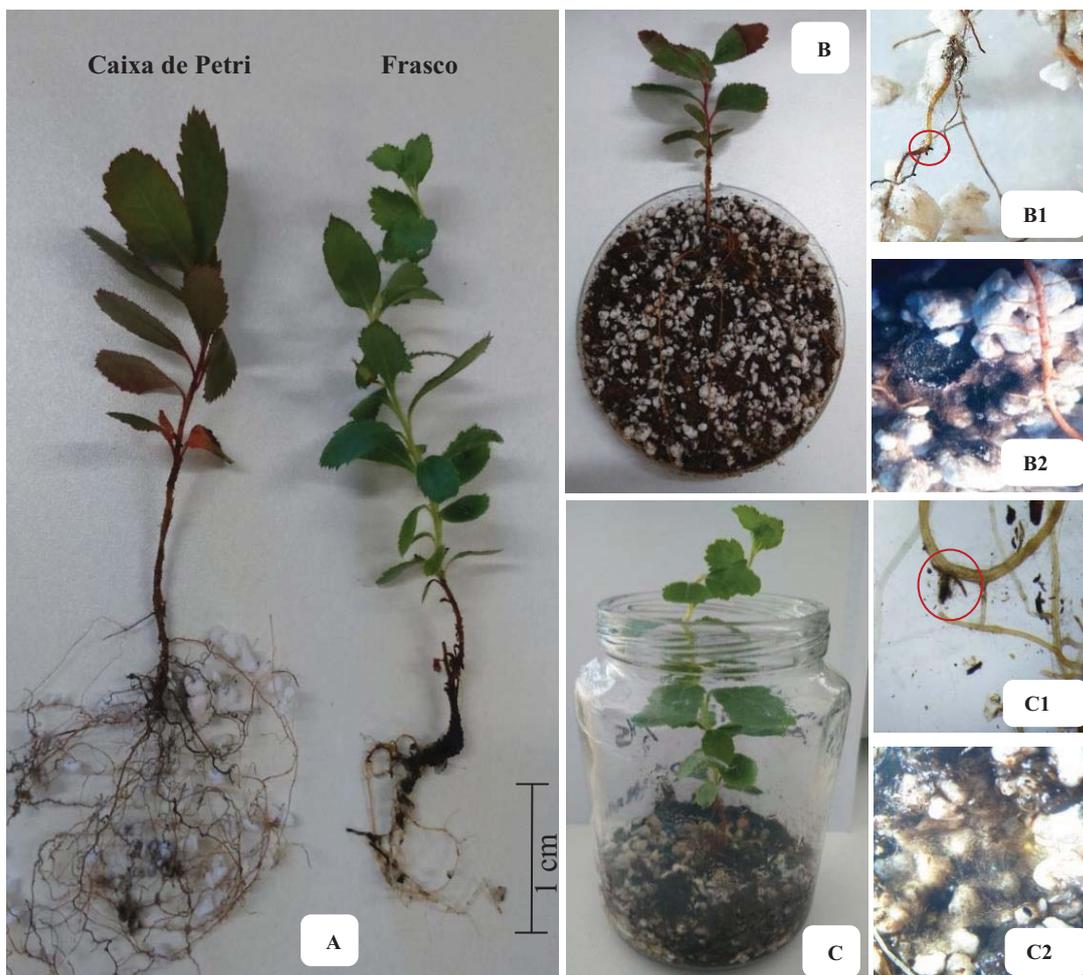


Figura22. Levantamento do ensaio de micorrização controlada entre *A. unedo* e *C. geophilum*. (A) Comparação dos medronheiros quanto ao desenvolvimento. (B) Medronheiro em caixa de Petri. (C) Medronheiro em frasco. (B1 e C1) Raízes de medronheiros micorrizadas, vistas à lupa, ampl 8x e 16x respectivamente. (B2 e C2) Colonização do substrato pelo fungo.

A obtenção de plantas micorrizadas com *Cenococcum geophilum*, poderá permitir uma vantagem no estabelecimento e adaptação em campo essencialmente porque este fungo apresenta características vantajosas como a tolerância à seca (remeter à introdução geral) e existe associado ao medronheiro em condições naturais. Desta forma, as plantas micorrizadas, quando colocadas em campo, à partida, tirariam vantagem, como por

exemplo na capacidade de sobrevivência à primeira estação de seca, quando comparadas com outras não micorrizadas. Em termos práticos, este tipo de protocolo poderá não ser aplicável. Uma alternativa para a produção em maior escala poderá ser a utilização de solo como inóculo natural para a micorrização, o que vai de encontro a estudos de Dulmer e colaboradores (2014).

De uma perspectiva ecológica, uma vez que *A. unedo* existe associado a florestas mistas de *Quercus* e *Pinus*, e que *C. geophilum* apresenta falta de especificidade para diferentes hospedeiros vegetais, a presença do medronheiro pode revelar um papel facilitador no desenvolvimento de outras espécies vegetais após perturbação, através da existência de redes de micélio comuns (Lancellotti *et al.*, 2014).

Seria interessante em trabalhos futuros, num ensaio de campo, colocar plantas micorrizadas com *C. geophilum* e plantas não micorrizadas (controlo) de forma a avaliar se haveriam diferenças significativas entre os dois grupos de plantas, sendo de esperar que este fungo não fosse substituído por comunidades de fungos autóctones, ajudando no estabelecimento das plantas em campo.

2.3.2. Caracterização anatómica de micorrizas

Após 4 meses do início do ensaio de micorrização, foi feito o levantamento das plantas e analisados os respectivos sistemas radiculares. A análise dos mesmos mostrou a presença de micorrizas em 7 das 11 plantas. Embora as micorrizas ainda não aparentassem o aspecto típico em forma de cruciforme (precisariam de mais tempo *in vitro* para terem o aspecto das micorrizas em campo), muito possivelmente pela curta duração do ensaio, já possuíam a presença de hifas entrelaçadas nas raízes e cor escura (Figura 23 A). Foram analisadas raízes não micorrizadas de medronheiro onde é visível um feixe de xilema ainda pouco desenvolvido e três bem nítidos (raízes tetrarcas) cercadas por 3-5 camadas de células corticais (Figura 23 B). Secções transversais de raízes micorrizadas com *C. geophilum* (Figura 23 C) mostraram a organização típica de micorrizas arbutóides com a presença de manto e rede de Hartig (Figura 23 D). Foi nas plantas resultantes do ensaio em

frascos que se obteve o melhor material e conseqüentemente os melhores cortes anatómicos.

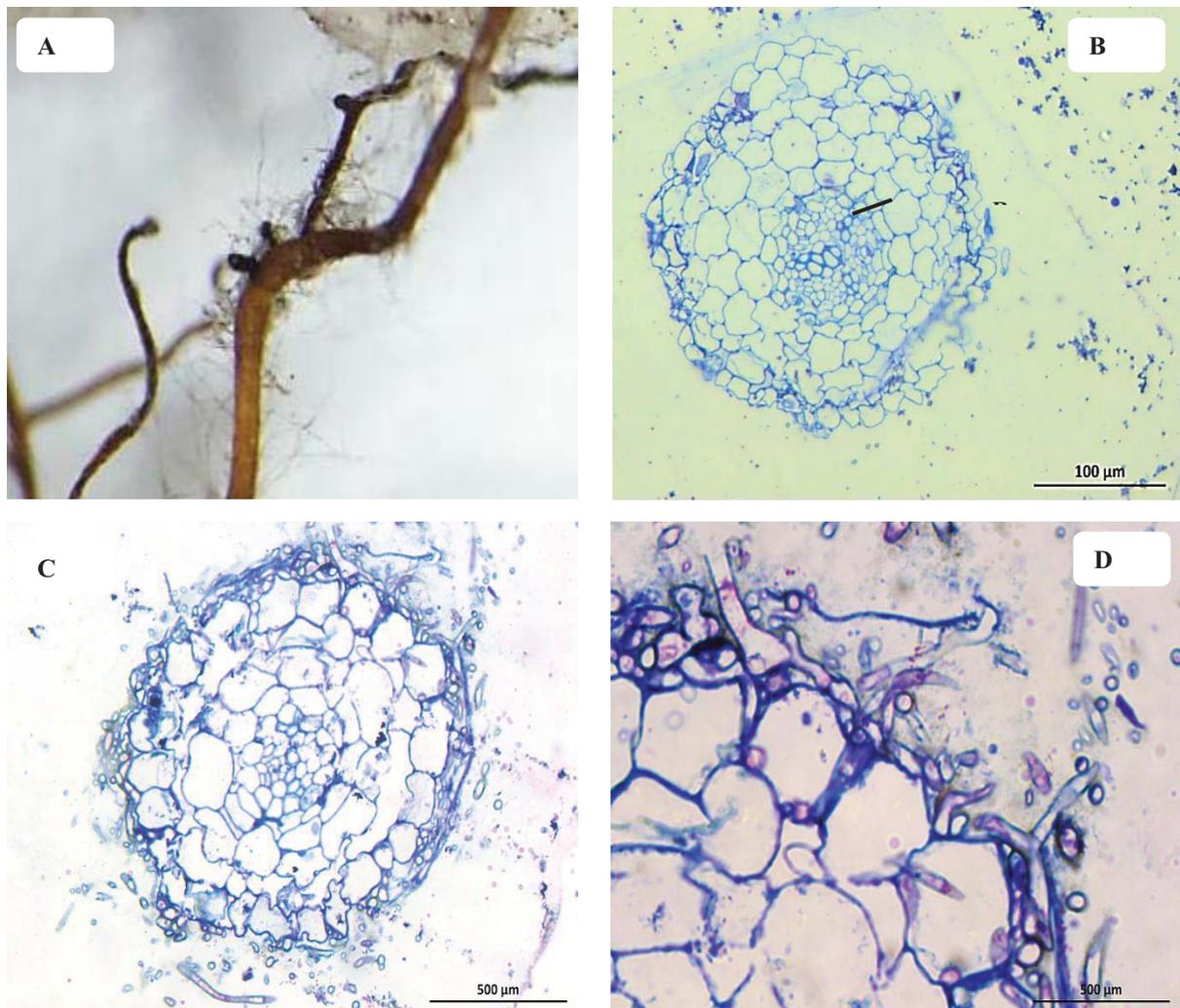


Figura23. Observação de micorrizas arbutóides após 4 meses do início da inoculação controlada com *C. geophilum*. A- Aspecto das raízes de medronheiro micorrizadas com o fungo em estudo, vistas à lupa com ampliação 30. B- Aspecto de raiz de medronheiro não micorrizada (controle), mostrando o padrão da raiz tetraarca (RT). C- Raiz micorrizada, onde é visível a presença do manto (M). D-Detalhes das secções transversais que mostram a rede de Hartig (RH), penetração intercelular e intracelular.

2.4. Bibliografia

Canhoto, J.M. (2010) Biotecnologia vegetal, da clonagem de plantas à transformação genética. Imprensa da Universidade de Coimbra.

De Fossard, R.A., Nitsch, C., Cresswell, R.J., Lee, H.C.M. (1974). Tissue and organ culture of Eucalyptus. *New Zealand Journal For Science* 4:267-278.

Dulmer, K. M., LeDuc, S. D., & Horton, T. R. (2014). Ectomycorrhizal inoculum potential of northeastern US forest soils for American chestnut restoration: results from field and laboratory bioassays. *Mycorrhiza*, 24(1), 65-74.

Gautheret, R.J. (1959). La culture des tissus végétaux, techniques et réalisations. Masson, Paris.

Gomes ,F. (2011). Strategies for the improvement of *Arbutus unedo* L. (strawberry tree): in vitro propagation, mycorrhization and diversity analysis . Dissertação, Universidade de Coimbra.

Grellier, B., Letouze, R., & Strullu, D. G. (1984). Micropropagation of birch and mycorrhizal formation in vitro. *New phytologist*, 97(4), 591-599.

Guerin-Laguette, A., Plassard, C., & Mousain, D. (2000). Effects of experimental conditions on mycorrhizal relationships between *Pinus sylvestris* and *Lactarius deliciosus* and unprecedented fruit-body formation of the Saffron milk cap under controlled soilless conditions. *Canadian journal of microbiology*,46(9), 790-799.

Lancellotti, E., Mirco, I., Zambonelli, A., Franceschini, A. (2014). Characterization of *Tuber borchii* and *Arbutus unedo* mycorrhizas. *Mycorrhiza* 24:481–486

Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol Plant* 15:473-497

Quinteiro, S.L., (2005). Respuesta de siete orígenes ibéricos de *Pinus pinaster* Aiton frente a la

inoculación en vivero con *Pisolithus tinctorius* y *Paxillus involutus*. PhD Thesis.

University of Santiago de Compostela.

Rincón, A., Alvarez, I. F., & Pera, J. (2001). Inoculation of containerized *Pinus pinea* L. seedlings with seven ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 11(6), 265-271.

Trappe J.M. (1964). Mycorrhizal host and distribution of *Cenococcum grani-forme*. *Lloydia* 27:100-106;

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Habitualmente a diversidade de corpos frutíferos não espelha a diversidade de fungos existente debaixo do solo (e.g. Baptista *et al.*, 2010; Gardes & Bruns, 1996; Karén & Nylund, 1997), o que se reflectiu na investigação da comunidade micorrízica associada ao medronheiro e ao pinheiro-bravo. O estudo (Capítulo I) permitiu através da observação de corpos frutíferos e do estudo da comunidade de fungos micorrízicos, perceber que estas comunidades de fungos não devem ser comparadas, uma vez que representam diferentes níveis de observação e identificação num habitat. Quando espécies florestais partilham o mesmo habitat há possibilidade de haver partilha de alguns fungos ectomicorrízicos (Richard *et al.*, 2005). *Helotiales sp.1* e *Russula densifolia* são o resultado – após amostragem e estudos moleculares - da partilha de fungos micorrízicos entre *A. Unedo* e *P. pinaster*, estas espécies crescem geralmente em associação. A informação resultante deste estudo pode ser usada como base para o conhecimento de fungos micorrízicos associados a *A. unedo* e *P. pinaster*, para conhecimento das espécies macrofúngicas existentes nas comunidades de *A. unedo*, *P. pinaster* e *Quercus robur* e como um bioensaio de saúde do ecossistema (Baptista *et al.*, 2010). Para melhor entendimento da comunidade de macrofungos e fungos micorrízicos (em particular associadas ao medronheiro), o tempo e esforço de amostragem terão de ser maiores, uma vez que a lista apresentada reflecte uma pequena amostra da diversidade de fungos existentes no local de estudo.

Uma revisão da literatura sobre micorrizas aponta de forma clara para o seu efeito positivo nas plantas, em vários aspectos em sistemas de cultivo. Tendo em conta o potencial interesse ecológico e económico do medronheiro, foi estabelecido um protocolo de micorrização controlada com *C. geophilum* (Capítulo II). Trabalhos anteriores de Gomes e colaboradores (2013) demonstraram sucesso na inoculação de *A. unedo* com o fungo *Pisolithus arhizus*. No entanto a referida espécie não é simbiote de *A. unedo* em condições naturais, o que compromete a relevância ecológica e o potencial de aplicação prática desses ensaios. No presente trabalho, foi utilizado *C. geophilum* na inoculação controlada com plantas de *A. unedo*. Quatro meses após o início do ensaio, foi possível observar micorrizas arbutóides com manto, rede de Hartig e penetração intracelular (Peterson & Massicotte, 2004). Apesar de o protocolo estabelecido ter permitido a obtenção de plantas micorrizadas, será importante otimizar o processo de descrições de micorrizas arbutóides (Peterson & Massicotte, 2004). Apesar de o protocolo estabelecido permitir a

obtenção de plantas micorrizadas, será importante otimizar o processo de forma a reduzir perdas de material e o tempo da síntese micorrízica. Em termos práticos, este tipo de protocolo poderá não ser aplicável em larga escala, por exemplo, para a produção de *A. unedo* em viveiros comerciais. Uma alternativa poderá ser a utilização de solo como inóculo natural para amicorrização.