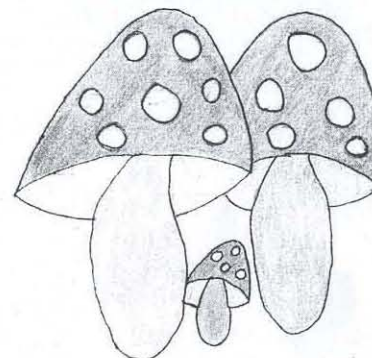


# A PANTORRA

ANAIS da Associação Micológica "A Pantorra"

7.º ENCONTRO

MICOLÓGICO



MEMÓRIAS

7.º CONGRESSO LUSO-GALAICO  
DE MACROMICOLOGIA

Os cogumelos

MOGADOURO

e a criança

ISBN: 972-98788-6-2

VOLUME 6

2 0 0 6



## Micorrização *in vitro* de germinantes de *Pinus pinaster*: Estudos histológicos e de crescimento

Costa A.<sup>1</sup>; Baptista P.<sup>1</sup>; Martins A.<sup>2</sup>

CIMO/Escola Superior Agrária de Bragança,  
Apart. 1 172, 5301-855 Bragança, Portugal

Escola Superior Agrária de Bragança,  
Apart. 1 172, 5301-855 Bragança, Portugal

### Resumo

As espécies florestais, nomeadamente as pertencentes ao género *Pinus* sp., estão normalmente dependentes da simbiose micorrízica para o seu desenvolvimento.

Foi objectivo deste trabalho estudar a capacidade do fungo ectomicorrízico, *Pisolithus tinctorius* formar ectomicorrizas com germinantes de *Pinus pinaster*, em condições *in vitro*, e avaliar o efeito da micorrização no crescimento das plântulas. Durante o processo de micorrização avaliou-se o desenvolvimento de estruturas micorrízicas, manto e rede de Hartig. Avaliou-se igualmente o efeito da micorrização nas taxas de crescimento das plantas, pela determinação de pesos frescos e secos, ao fim de 90 dias de inoculação.

Os resultados aqui apresentados revelam que o fungo apresentou capacidade de formação de estruturas micorrízicas, em condições *in vitro*. Após 10 dias de inoculação é possível observar um manto e o início do desenvolvimento da rede de Hartig. Para os tempos do presente estudo, não se registaram diferenças significativas, em termos de peso fresco e seco, entre plantas inoculadas e não inoculadas.

**Palavras-chave:** *Pinus pinaster*, *Pisolithus tinctorius*, micorrização *in vitro*, estudo histológico

### Abstract

Forestry species, namely species belonging genus *Pinus*, are normally dependent on the establishment of mycorrhizal symbiosis for its development.

The present work intends to study the capacity of the ectomycorrhizal fungus, *Pisolithus tinctorius* to establish symbiosis with *Pinus pinaster* roots, under *in vitro* conditions, and to evaluate its effect in the growth of plants. The mycorrhizal process was monitored at regular time periods in order to evaluate the mantle and Hartig net formation. The growth rates of mycorrhizal and nonmycorrhizal plants, in terms of fresh and dry weights, were also determined after 90 days of inoculation.

Under *in vitro* conditions *P. tinctorius* showed capacity to develop mycorrhizal structures. After 10 days a mantle can be observed and

a Hartig net is forming. For the times under study, no significant differences were found between mycorrhizal and nonmycorrhizal plants in terms of fresh and dry weights.

**Key-words:** *Pinus pinaster*, *Pisolithus tinctorius*, *in vitro* mycorrhization, histological study

### Introdução

Nas últimas décadas, tem-se assistido a um aumento da prática da micorrização controlada de espécies florestais, verificando-se uma procura crescente de plantas inoculadas junto de viveiros florestais.

O efeito benéfico da micorrização traduz-se no aumento da sobrevivência das plantas no momento da transplantação para local definitivo, na sua resistência a condições de campo desfavoráveis e no aumento da produção vegetal, devido à maior disponibilidade de água e nutrientes. Contudo, os estudos de micorrização, efectuados em pinheiro bravo (*Pinus pinaster*), são escassos em relação aos de outras espécies florestais. Estes baseiam-se essencialmente na descrição morfológica de micorrizas que surgem em condições naturais (Garcia, 1998) e no desenvolvimento de técnicas de produção de micélio fúngico, para ulterior aplicação em micorrização controlada no viveiro (Garbaye, 1991). As espécies fúngicas, normalmente utilizadas nesta prática, são diversificadas, destacando-se *Pisolithus tinctorius*, *Scleroderma citrinum*, *Suillus granulatus*, *Amanita phalloides* e *Hebeloma cylindrosporum*, por terem demonstrado aptidão para formar micorrizas e por permitirem uma melhoria das condições fisiológicas das plantas hospedeiras em condições de viveiro (*in* Quinteiro, 2005).

Em Portugal, são poucos os estudos efectuados ao nível da micorrização de *P. pinaster* e seus efeitos na planta hospedeira. A diminuição das áreas florestadas por *P. pinaster* a que se tem vindo a assistir nos últimos anos, e o crescente interesse por parte dos viveiristas florestais pela utilização da prática de micorrização, tem fomentado a realização de estudos nesta área. O trabalho aqui apresentado pretende avaliar os efeitos desta associação ao nível do crescimento de plântulas de *P. pinaster*, quando micorrizadas com *Pisolithus tinctorius*. Neste sentido, acompanhou-se o processo de micorrização *in vitro* destas plântulas, e estudou-se: i) o desenvolvimento das estruturas micorrízicas (manto e rede de Hartig), por observação estereomicroscópica e microscópica e ii) o efeito da micorrização nas taxas de crescimento das plântulas, pela determinação de pesos frescos e secos, ao fim de 90 dias de inoculação.

Os resultados aqui apresentados poderão contribuir para esclarecer a importância da utilização de fungos micorrízicos em inoculações controladas em viveiros ou florestações, permitindo dar uma resposta mais eficaz às necessidades actuais de mercado de espécies florestais para plantação.

## Material e métodos

### Material vegetal

As sementes de *P. pinaster*, foram postas a germinar em placas de Petri (14 cm de diâmetro), contendo meio Melin-Norkans modificado (MMN) e incompleto (sem casaminoácidos e extracto de malte). Todo este processo decorreu em condições de assepsia, em câmara de fluxo laminar.

A desinfecção das sementes foi efectuada em lixívia comercial, durante 30 minutos, seguida pela passagem em água destilada estéril. Ulteriormente foram imersas em água oxigenada, a 3% (v/v), durante 10 minutos, seguida novamente por três lavagens em água destilada estéril.

As placas de Petri, com 4 sementes cada, foram mantidas no escuro, em condições ambientais controladas (25 °C), tendo aí permanecido durante 1 mês sem qualquer intervenção, até ocorrer germinação e desenvolvimento da parte aérea. Ao fim do tempo referido anteriormente estas plântulas foram utilizadas para os ensaios de micorrização.

### Cultura de fungos micorrízicos

O fungo micorrízico utilizado foi *Pisolithus tinctorius*, dada a larga gama de hospedeiros com que consegue associar-se e ainda por se tratar de um fungo pioneiro na sucessão micorrízica.

As culturas axénicas do fungo *P. tinctorius* foram mantidas em caixas de Petri contendo meio MMN modificado (Martins, 2004). A sub-cultura do fungo efectuou-se com intervalos de três semanas, sendo esta realizada por transferência de 4 inóculos de 0,8 cm de diâmetro retirados da região periférica das culturas em crescimento activo e colocados sobre meio de cultura fresco. A incubação das culturas de fungo foi feita no escuro, a uma temperatura de 23 – 25 °C.

### Micorrização in vitro

A inoculação micorrízica foi realizada em placas de Petri, contendo germinantes cuja raiz apresentava um comprimento médio de 4 cm, em condições de assepsia, na câmara de fluxo laminar. Perto da raiz de cada germinante foi colocado um inóculo de fungo *P. tinctorius* com 0,2 cm de diâmetro, retirado da região periférica das culturas em crescimento activo.

As placas de Petri foram envoltas em papel de alumínio na zona radicular das plantas e foram postas, em posição vertical, em condições ambientais controladas (fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de 100  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , temperaturas de 25 °C durante o dia e 19 °C durante a noite), tendo aí permanecido durante o processo de micorrização. Foram testadas 30 germinantes por ensaio.

Como controlo destes ensaios utilizaram-se germinantes que foram sujeitos às mesmas condições, mas que não foram inoculadas com qualquer fungo.

### Observação do estado de micorrização das raízes

O desenvolvimento dos germinantes foi observado ao longo de 45 dias após inoculação. A monitorização das raízes foi realizada macroscopicamente, à lupa e ao microscópio. A observação esteromicroscópica foi realizada, numa lupa binocular Nikon SMZ-U, com máquina fotográfica incorporada (Nikon FX-35DX). A observação microscópica das raízes foi realizada em secções transversais, feitas à mão, de material fresco, branqueado com hipoclorito de sódio 0,5% (cloro activo). Os cortes foram observados e fotografados em diferentes ampliações num microscópio óptico Leitz laborlux 12.

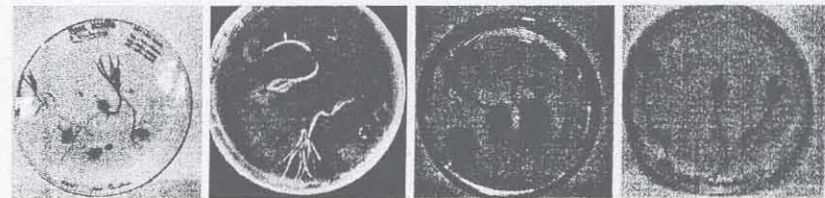
### Determinação dos pesos frescos e secos

Os pesos secos e frescos das plantas micorrizadas e não micorrizadas foi determinado, na parte aérea e na parte radicular para plantas com 90 dias de micorrização. O material fresco foi pesado e posto a secar a 60 °C. Após 48h de secagem efectuou-se a sua pesagem e determinou-se a relação entre o peso seco e o peso fresco. A relação entre os pesos secos e frescos de plantas micorrizadas e não micorrizadas foram também determinados.

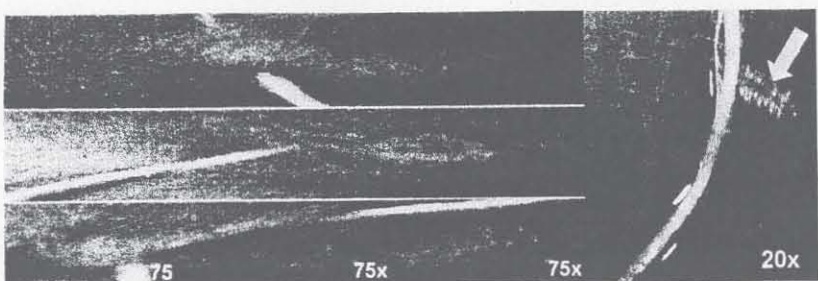
## Resultados

### Observação do estado de micorrização das plantas

Ao fim de dez dias de inoculação foi possível observar que as raízes contactavam com o micélio, e nalguns casos, apresentavam mesmo adesão de hifas à sua superfície (Estampa 1 e 2). Depois do primeiro contacto com o fungo, verificou-se que a taxa de ramificação de raízes micorrizadas era superior às das plantas controlo (sem fungo) (Estampa 1 e 2). Nas raízes não micorrizadas foi possível observar a formação de pêlos radiculares, o que não ocorreu nas raízes micorrizadas. Ao fim dos 30 dias de inoculação o sistema radicular das plantas encontrava-se totalmente envolvido pelo micélio do fungo (Estampa 1 e 2).

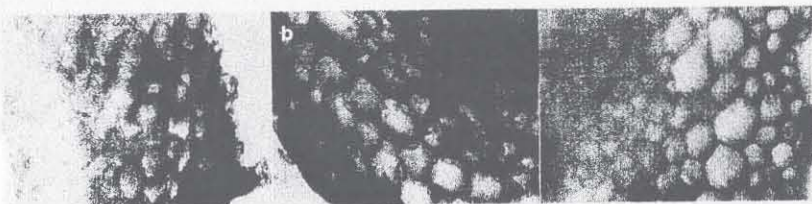


Estampa 1 – Observação macroscópica de germinantes de *P. pinaster* 6, 10 e 30 dias após inoculação com *P. tinctorius* (coluna da esquerda) e *A. muscaria* (coluna da direita). Apresentam-se igualmente germinantes de *P. pinaster*, sem fungo, que constituiu a testemunha do ensaio (controlo).



Estampa 2 – Observação esteromicroscópica de germinantes de *P. pinaster* 10, 30 e 45 dias após inoculação com *A. muscaria* (coluna da esquerda) e *P. tinctorius* (coluna da direita). Apresentam-se igualmente germinantes de *P. pinaster*, sem fungo, que constituiu a testemunha do ensaio (controlo). Ao fim dos 10 dias de inoculação, observa-se o contacto entre o micélio e o sistema radicular das plântulas. Ao fim de 30 e 45 dias de inoculação o sistema radicular das plântulas encontra-se totalmente envolvido pelo micélio. Nas plântulas controlo observa-se a formação de pêlos radiculares que não ocorrem nas raízes micorrizadas (setas a cheio).

A observação microscópica das raízes inoculadas com *P. tinctorius*, ao longo do processo de micorrização, mostra que a formação do manto e da rede de Hartig se inicia após 10 dias de contacto raiz-fungo (Estampa 3). Ao fim dos 30 dias de inoculação as estruturas micorrízicas encontram-se bem desenvolvidas, apresentando um manto com uma espessura superior e uma rede de Hartig peri-epidérmica multiseriada.



Estampa 3 – Secções transversais de raízes de *P. pinaster* 10 e 30 dias após inoculação com *A. muscaria* (coluna da esquerda) e *P. tinctorius* (coluna da direita). Apresenta-se igualmente um corte transversal de raiz de *P. pinaster* não inoculado, que constituiu a testemunha do ensaio (controlo). Ampliação 400x.  
a) Após os 10 dias de inoculação, em ambos os sistemas micorrízicos foram observadas estruturas micorrízicas, manto (m) e rede de Hartig (seta a cheio) em início de desenvolvimento. b) Ao fim dos 30 dias de inoculação, observa-se um manto e uma rede de Hartig com uma espessura superior nas raízes inoculadas com *P. tinctorius* face às inoculadas com *A. muscaria*.

## Parâmetro de crescimento

Os resultados obtidos em termos de Pf e Ps da parte aérea e radicular das plantas inoculadas de *P. pinaster* em relação às não inoculadas, mostram que, apesar de não se verificarem diferenças significativas ao fim de 90 dias, as plantas micorrizadas apresentam valores mais altos de Pf e Ps da parte aérea e valores mais baixos da parte radicular (Quadro 1).

As relações Ps/Pf da parte radicular e da parte aérea de plantas micorrizadas e não micorrizadas, não apresentaram diferenças significativas ao fim dos 90 dias de contacto raiz-fungo. Contudo, verificou-se que esta relação, apesar de não ser estatisticamente diferente, era superior em plantas inoculadas com *P. tinctorius* comparativamente às plantas controlo (sem fungo). No que respeita aos resultados da parte radicular, porém, são as plantas controlo as que apresentam mais baixas relações Ps/Pf.

## Discussão e conclusões

A metodologia de micorrização de germinantes de *P. pinaster*, utilizada neste trabalho, mostrou-se adequada aos propósitos do mesmo. Ao fim de 10 dias, o micélio de *P. tinctorius* tinha atingido as raízes das plântulas, e ao fim dos 30 dias o sistema radicular encontrava-se totalmente envolvido pelo micélio. A capacidade de crescimento de *P. tinctorius* confirma a sua conhecida capacidade para micorrização em condições *in vitro*, posto que, com o seu desenvolvimento, atinge rapidamente as raízes das plantas e inicia o processo de associação.

Foi possível observar um manto fúngico e rede de Hartig que, tal como referem Smith & Read (1997) não ultrapassam as células corticais. A ausência de pêlos radiculares é outra característica morfológica observada nas raízes micorrizadas (Martins, 2004). Pelo contrário, nas plantas não inoculadas estes apareciam abundantemente.

Em relação aos Pf e Ps obtidos ao fim de 90 dias em partes aéreas e radiculares de plantas micorrizadas e não micorrizadas de *P. pinaster*, podemos dizer que, tendo em conta que se trata de uma espécie florestal, os resultados ao fim de 90 dias indiciam crescimentos diferenciais da parte aérea e radicular, como anteriormente verificado para outras espécies (Martins, 2004). Verificou-se que a parte aérea da planta é positivamente influenciada pela micorrização, acontecendo o oposto em relação à parte radicular. Tal efeito, tem frequentemente sido considerado como uma melhoria fisiológica da planta que, investindo menos energia na parte radicular, consegue, por via da associação com o fungo micorrízico, explorar volumes de solo acrescidos, aumentando deste modo a assimilação de nutrientes e água para a planta. Nas plantas de *P. pinaster* micorrizadas com *P. tinctorius* verificou-se, não só, uma alteração morfológica do sistema radicular, mas também Pf e Ps inferiores aos de plantas controlo.

As relações Ps/Pf determinadas na parte aérea e radicular de plantas micorrizadas e testemunha, ao fim de 90 dias de inoculação, não

apresentaram diferenças significativas, contudo, os valores foram ligeiramente superiores em plantas micorrizadas com *P. tinctorius*.

Os resultados preliminares obtidos nos ensaios de micorrização *in vitro* de *P. pinaster* com *P. tinctorius* mostram que, à semelhança do que se verificou com outras associações simbióticas, ocorrem alterações morfológicas e fisiológicas nas plantas micorrizadas, resultando, frequentemente, num acréscimo de biomassa. A repetição dos ensaios *in vitro* e *ex vitro*, com quantificação dos parâmetros para os mesmos tempos de ensaio, estão em curso no sentido de avaliar as potenciais vantagens da micorrização prévia de plantas de *P. pinaster*.

### Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo Projecto AGRO 689 "Demonstração do papel dos macrofungos na vertente agronómica, económica e ambiental no Nordeste Transmontano. Aplicação à produção de plantas de castanheiro, pinheiro e carvalho".

### Bibliografia

- Garbaye J., 1991. Utilisation des mycorhizes en sylviculture, in: Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées, P.G. Strullu (Ed), Lavoisier, Paris.
- García G., 1998. Caracterización y aspectos dinámicos del componente ectomicorrícico de los ecosistemas mediterráneos. Tesis doctoral, Universidad de Murcia, Murcia (España).
- Martins A., 2004. Micorrização controlada de *Castanea sativa* Mill.: Aspectos fisiológicos da micorrização *in vitro* e *ex vitro*. Dissertação de Doutoramento em Biotecnologia Vegetal. Faculdade de Ciências de Lisboa. Universidade Clássica de Lisboa. 506 pp.
- Martins A., 1997. Micorrização *in vitro* de plantas micropropagadas de castanheiro (*Castanea sativa* Mill.). Série de Estudos Escola Superior Agrária, Edição do Instituto Politécnico de Bragança. 90pp.
- Smith SE, Read DJ, 1997. Mycorrhizal symbiosis, 2nd edition, Academic Press.
- 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*. Tese de doutoramento. Universidade de Santiago de Compostela. 218pp.

## Estudo de intoxicações causadas por ingestão de macrofungos na região do Alto Alentejo.

Morgado, L.<sup>1</sup>, Martins, L.<sup>2</sup>, Gonçalves, H.<sup>2</sup>, Oliveira, P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade de Évora, Departamento de Biologia, Apartado 94 7002-554 ÉVORA

<sup>2</sup> Serviço de Pediatria, Hospital do Espírito Santo de Évora, Lg. Sr. da Pobreza, 7000-811 ÉVORA

### Resumo

A presente comunicação relata os primeiros resultados visando o conhecimento de intoxicações com macrofungos (micetismos) no Alto Alentejo, e as suas causas. Como ponto de partida estudaram-se casos classificados como micetismos nos registos do Serviço de Urgência do Hospital do Espírito Santo de Évora. Com base nos processos clínicos, determinaram-se provisoriamente possíveis síndromes de intoxicação, o que teve de complementar-se com a realização de inquéritos junto dos indivíduos atingidos, nos quais se procurou identificar as espécies consumidas e registar outras ocorrências de intoxicação com macrofungos, tal como identificar potenciais informadores. Assim, puderam confirmar-se, esclarecer-se ou mesmo corrigir-se os diagnósticos baseados nos processos clínicos. A maioria das ocorrências analisadas esteve associada ao consumo de *Amanita ponderosa* Mal. & Heim, e manifestou-se frequentemente com o síndrome falóide, pela ingestão concomitante de *A. verna* (Bull.:Fr.) Lamark. Os inquéritos permitiram também documentar os hábitos de apanha e consumo de macrofungos.

**Palavras-chave:** Micetismo, intoxicações, síndromes micofágicas, *Amanita ponderosa*, silarca, Alentejo, etnomicologia

### Summary

The present communication reports on the first results aiming at the knowledge on poisoning with macrofungi in Alto Alentejo, and the respective causes. As starting point, cases classified as this type of poisoning, in the Emergency Service of the Espírito Santo Hospital (Évora) archives, were studied. Based on the clinical files, provisional determinations of possible intoxication syndromes were made, and then complemented by enquiries with the patients, from which an identification of the poisoning species was attempted, along with the recording of similar occurrences and possible informants. The diagnoses based on the clinical files could thus be confirmed, clarified or even corrected. Most of the analysed occurrences were associated with the consumption of *Amanita ponderosa* Mal. & Heim and generally produced the phalloid syndrome