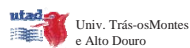


# **II Congresso Iberico do Castanheiro**



**Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro  
Vila Real, Junho 20-22, 2007**



## P5.06. EFEITO DE EXTRACTOS DE RAÍZES ELICIADAS DE *CASTANEA SATIVA* NO CRESCIMENTO DO FUNGO ECTOMICORRÍZICO *PISOLITHUS TINCTORIUS*

<sup>1</sup>Baptista, P.; <sup>1</sup>Martins, A.; <sup>2</sup>Tavares, R.M.; <sup>2</sup>Lino-Neto, T.

<sup>1</sup> CIMO- Escola Superior Agrária, *Campus* de Sta. Apolónia, Apt. 1172, 5301-855 Bragança, Portugal

<sup>2</sup> Departamento de Biologia/Centro de Biologia, Universidade do Minho, *Campus* de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

### RESUMO

O castanheiro (*Castanea sativa* Mill.) estabelece associação com numerosas espécies de fungos ectomicorrízicos, estando descritos os efeitos benéficos para a planta após micorrização com *Pisolithus tinctorius*. Neste processo é essencial que ocorra a troca de sinais entre os simbiosites, para que seja reconhecida a sua compatibilidade e para que ocorra a formação dos órgãos ectomicorrízicos. Neste trabalho são fornecidas evidências que sugerem a capacidade de extractos de raízes de castanheiro, nos estádios iniciais de contacto com *P. tinctorius* regularem o crescimento do fungo micorrízico.

**Palavras-chave:** *Castanea sativa*, *Pisolithus tinctorius*, simbiose ectomicorrízica, sinais rizosféricos

### 1. INTRODUÇÃO

A associação de fungos ectomicorrízicos com as raízes de muitas espécies arbóreas, incluindo o castanheiro (*Castanea sativa* Mill.), constitui uma das interacções mais importantes que ocorrem ao nível da rizosfera. O estabelecimento da micorrização com o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch origina modificações fisiológicas no castanheiro, resultando numa melhoria para o seu crescimento, desenvolvimento e resistência/tolerância ao fungo *Phytophthora cinnamomi*, causador da doença da “tinta” (Martins *et al.*, 1997; Martins, 2004). Apesar da reconhecida importância da micorrização, a natureza molecular dos sinais emitidos bem como os mecanismos de reconhecimento e interacção dos parceiros simbióticos, essenciais para a iniciação, o desenvolvimento e a manutenção de uma simbiose ectomicorrízica funcional encontram-se por esclarecer.

Alguns compostos identificados em exsudados e/ou extractos de raiz têm sido referidos como desempenhando um papel importante no estabelecimento da comunicação raiz-microrganismos (revisto por Hirsch *et al.*, 2003; Bais *et al.*, 2004). No presente trabalho foi estudado o efeito de extractos proteicos, obtidos de raízes de castanheiro nas fases iniciais de micorrização com o fungo *P. tinctorius*. Foi avaliada a capacidade estimuladora/inibidora de extractos proteicos de raízes eliciadas, com diferentes tempos de contacto (0-48 horas) com o fungo *P. tinctorius*, no crescimento deste fungo ectomicorrízico em condições “in vitro”.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Após germinação de sementes desinfectadas de *Castanea sativa*, efectuou-se a poda radicular e promoveu-se o crescimento de plântulas num sistema hidropónico. A inoculação das plântulas foi efectuada por transferência do micélio de *P. tinctorius* (crescido em meio Melin-Norkans) para os frascos de cultura contendo as plântulas com 4 meses. Como controlo, foram utilizadas plântulas não inoculadas, crescidas nas mesmas condições. Ao fim de 0, 0,5, 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 24 e 48 horas de contacto raiz-fungo foram recolhidas aleatoriamente quinze plantas que se subdividiram em três grupos, de cinco plantas cada. Idêntico procedimento foi efectuado para as plantas controlo. Após colheita, as raízes foram imediatamente maceradas em azoto líquido e armazenadas a -80°C.

Os extractos proteicos foram preparados utilizando tampão de extracção (1g pf/4mL tampão de extracção). Após quantificação e esterilização por filtração, 24 µg de proteína extraída foram espalhadas uniformemente para a superfície de 10 mL de meio MMN. No controlo foi aplicado idêntico volume de tampão utilizado no processo de extracção de proteínas. Após inoculação com *P. tinctorius*, o crescimento radial das colónias fúngicas e as características macroscópicas foram avaliadas durante 30 dias após inoculação. Foram efectuados 5 ensaios para cada tempo de inoculação.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito de extractos proteicos de raízes de castanheiro sujeitas a diferentes tempos de contacto com o fungo, no crescimento radial de colónias de *P. tinctorius*, foi analisado ao fim de 8 e de 17 dias de crescimento (Figura 1). Os resultados indicam que a presença de extractos radiculares de *C. sativa* estimulavam o crescimento de *P. tinctorius*, a partir dos 17 dias de cultura (Figura 1A). A promoção do crescimento de fungos ectomicorrízicos e arbusculares, por exsudados e/ou extractos radiculares, tem sido referida em algumas interacções micorrízicas (revisto por Giovannetti & Sbrana, 1998; Lum & Hirsch, 2003). De entre os compostos secretados em exsudados radiculares, a rutina (Lagrange *et al.*, 2001), a zeatina (Barker & Tagu, 2000; Martin *et al.*, 2001), os flavonóides e isoflavonóides (Kapulnik *et al.*, 1996; Weiss *et al.*, 1997; Harrison, 1999; Lum & Hirsch, 2003) têm sido apontados como tendo um efeito indutor no crescimento micelial.

O efeito estimulador dos extractos radiculares de *C. sativa* eliciados por *P. tinctorius* no crescimento do fungo não foi evidente nos primeiros 8 dias de cultura, verificando-se inclusivamente para alguns extractos um efeito inibidor (Figura 1B). De facto, logo após a inoculação verificou-se existir uma inibição significativa do crescimento quando eram utilizados os extractos preparados com raízes postas em contacto com o fungo durante 2 a 9 horas e também às 15 horas. Este efeito inibitório pode ser o resultado da produção de alguns compostos em consequência da inoculação com *P. tinctorius*, deixando de ser observado a partir dos 17 dias de ensaio provavelmente devido à sua degradação e/ou à sua inactivação por parte do fungo cultivado. O decréscimo verificado na estimulação do crescimento de *P. tinctorius* por parte de extractos proteicos de raízes poderá ser relevante durante o processo de ectomicorrização. A restrição no crescimento e, consequentemente, da invasão dos tecidos da planta hospedeira por fungos diferentes daquele que iniciou o processo de

micorrização (inclusivamente da mesma espécie) poderá promover o estabelecimento da associação simbiótica. Esta hipótese necessita, no entanto, de confirmação mediante a realização de ensaios semelhantes utilizando espécies fúngicas diferentes.

Os resultados indicam ainda que o aumento do crescimento radial de *P. tinctorius* foi variável em função do tempo de contacto raiz-fungo do extracto radicular utilizado (Figura 1A). O extracto de raiz de *C. sativa* não eliciada (0 horas) promoveu significativamente o crescimento radial de *P. tinctorius*, comparativamente ao controlo. De igual modo, os extractos proteicos de raízes eliciadas sujeitas a 2, 11 e após 24 horas de contacto com o fungo, estimularam o crescimento do *P. tinctorius*, observando-se valores significativamente superiores aos observados no controlo. Quando foram utilizados extractos proteicos obtidos de raízes eliciadas, no intervalo 3 a 9 horas de contacto com o fungo e ao fim de 15 horas de contacto, verificou-se uma diminuição do estímulo verificado no crescimento do fungo. Estes resultados sugerem que as primeiras 3 horas de eliciação poderão corresponder ao tempo necessário para a percepção, transdução de sinal e expressão de genes envolvidos na regulação do crescimento do fungo.

Analisando a capacidade estimuladora/inibidora de crescimento do fungo ao longo do tempo de eliciação dos extractos radiculares, verifica-se um padrão muito semelhante ao observado para a quantificação dos níveis de  $H_2O_2$  determinado no mesmo sistema micorrízico (Baptista *et al.*, 2007). Apesar do  $H_2O_2$  produzido pelas raízes de castanheiro, durante a primeiras 48 horas de contacto raiz-fungo, não explicar directamente a redução do estímulo verificado no crescimento fúngico (até porque possivelmente esta ROS seria completamente degradada no decurso dos 30 dias em que demorou o ensaio), poderá desempenhar funções ao nível da sinalização.

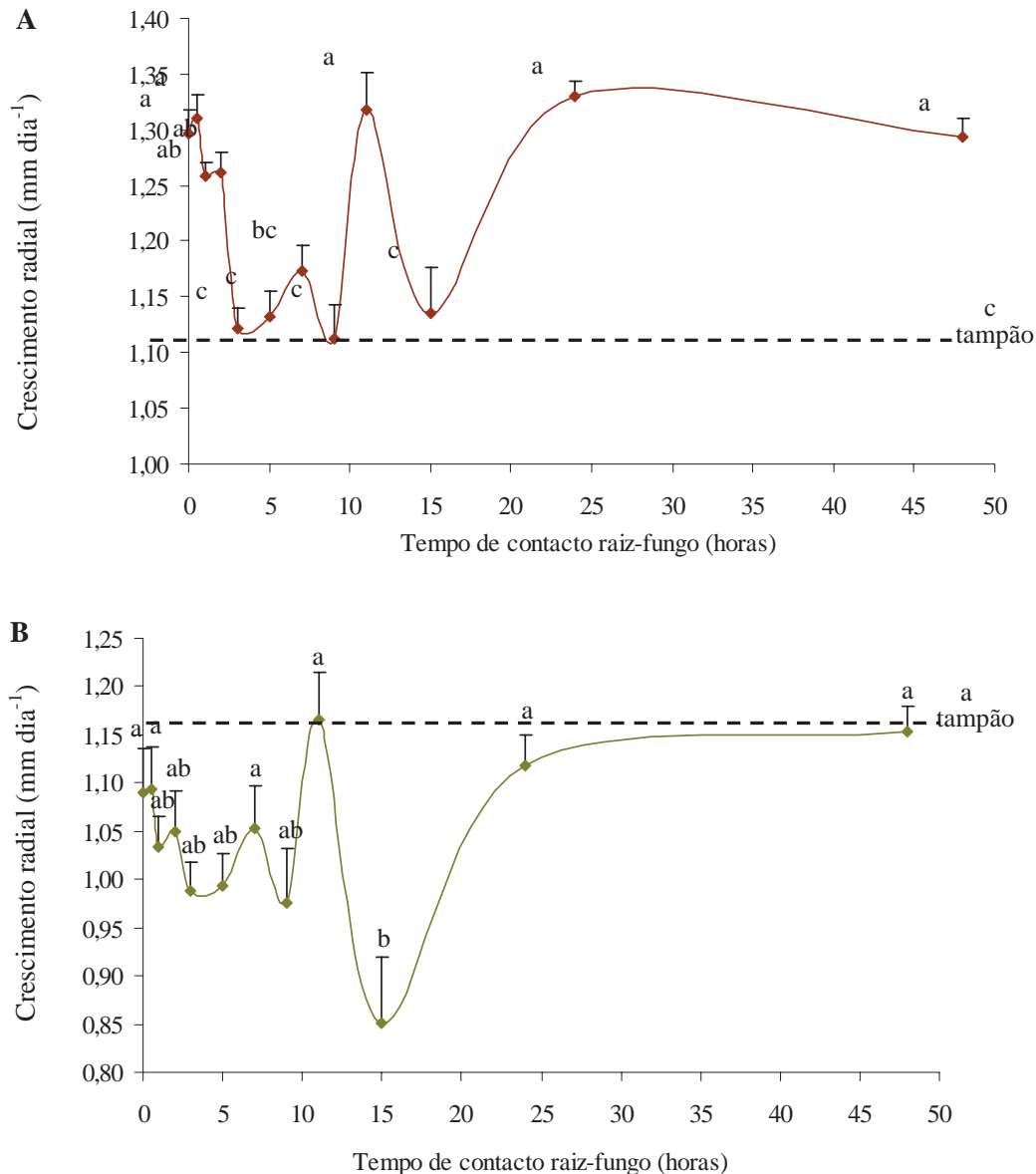


Figura 1. Crescimento radial de *Pisolithus tinctorius*, determinado ao fim de 8 (B) e 17 (A) dias de incubação em meio MMN complementado com extractos proteicos radiculares de plântulas de *Castanea sativa* eliciadas com *P. tinctorius* (0-48 horas). Como controlo foi utilizado meio MMN contendo tampão de extracção (linha a tracejado). A barra indica média  $\pm$  erro padrão (n=5). Valores com a mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de  $p < 0,05$

A análise macroscópica de *P. tinctorius*, crescido na presença de extractos radiculares de plântulas de castanheiro eliciadas por *P. tinctorius* ou tampão de extracção (controlo), não evidenciaram diferenças significativas (Figura 2). A presença de extractos radiculares eliciados não induziram alterações morfológicas no fungo, nem a síntese de pigmentos que pudessem alterar a coloração da cultura. Este aspecto é relevante uma vez que muitas micotoxinas, como as naftoquinonas de *Penicillium* e *Aspergillus* são pigmentadas (Loguercio-Leite *et al.*, 2006). Adicionalmente, alguns pigmentos têm função antioxidativa, como por exemplo os  $\beta$ -carotenos e a torularodina (Loguercio-Leite *et al.*, 2006).

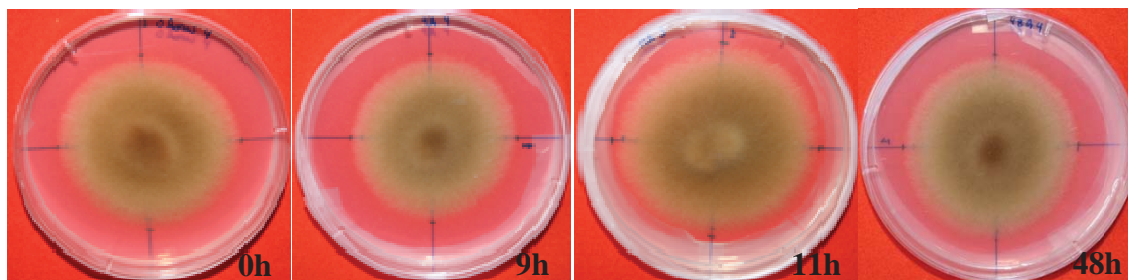


Figura 2. Aspecto macroscópico de *Pisolithus tinctorius*, 23 dias após inoculação, em meio de cultura MMN contendo extractos proteicos radiculares de plântulas de *Castanea sativa*. Cada placa corresponde ao ensaio de um extracto proteico de raízes de castanheiro eliciadas, sendo indicado o período de tempo de interacção com *P. tinctorius* a que se refere

## Agradecimentos

Este trabalho foi realizado no âmbito dos projectos AGRO 689 e FCT (POCTI/BSE/38059/ 2001)

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bais, H., Park, S.-W., Weir, T., Callaway, R., Vivanco, J. (2004). How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends Plant Sci* 9, 26-32.
- Baptista, P.; Martins, A.; Pais, M.S.; Tavares, R., Lino-Neto, T. (2007). Involvement of reactive oxygen species during early stages of ectomycorrhiza establishment between *Castanea sativa* and *Pisolithus tinctorius*. *Mycorrhiza* (DOI 10.1007/s00572-006-0091-4).
- Barker, S.J., Tagu, D. (2000). The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbioses. *Journal of Plant Growth Regulation* 19, 144-154.
- Giovannetti, M., Sbrana, C. (1998). Meeting a non-host: the behaviour of AM fungi. *Mycorrhiza* 8, 123-130.
- Harrison, M.J. (1999). Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 361-389.
- Hirsch, A.M., Bauer, W.D., Bird, D.M., Cullimore, J., Tyler, B., J., Y. (2003). Molecular signals and receptors: controlling rhizosphere interacting between plants and other organisms. *Ecology* 84, 858-868.
- Kapulnik, Y., Volpin, H., Itzhaki, H., Ganon, D., Galili, S., David, R., Shaul, O., Elad, Y., Chet, I., Okon, Y. (1996). Suppression of defence responses in mycorrhizal alfalfa tobacco roots. *New Phytologist* 133, 59-64.
- Lagrange, H., Jay-Allmand, C., Lapeyrie, F. (2001). Rutin, the phenolglycoside from eucalyptus root exudates, stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentrations. *New Phytol.* 149, 349-355.
- Loguercio-Leite, C., Groposo, C., Dreschler-Santos, E.R., Figueiredo, N.F., Godinho, P.S., Abrão, R.L. (2006). A particularidade de ser um fungo –I. *Constituintes celulares. Biotemas* 19, 17-27.
- Lum, M.R., Hirsch, A.M. (2003). Roots and their symbiotic microbes: strategies to obtain nitrogen and phosphorus in a nutrient-limiting environment. *Journal of Plant Growth Regulation* 21, 368-382.
- Martin, F., Duplessis, S., Ditengou, F., Lagrange, H., Voiblet, C., Lapeyrie, F. (2001). Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signals and communication genes. *New Phytologist* 151, 145-154.
- Martins, A. (2004). Micorrização controlada de *Castanea sativa* Mill.: aspectos fisiológicos da micorrização *in vitro* e *ex vitro*. In *Biotecnologia Vegetal* (Lisboa: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa), pp. 566.
- Martins, A., Casimiro, A., Pais, M.M.S. (1997). Influence of mycorrhization on physiological parameters of micropropagated *Castanea sativa* Mill. plants. *Mycorrhiza* 7, 161-165.
- Weiss, M., Mikolajewski, S., Peipp, H., Schmitt, U., Schmidt, J., Wray, V., Strack, D. (1997). Tissue-specific and development-dependent accumulation of phenylpropanoids in Larch Mycorrhizas. *Plant Physiology* 114, 15-27.