

Anabela Martins

**Micorrização *in vitro***  
de plantas  
micropropagadas  
de castanheiro  
(*Castanea sativa* Mill)



SÉRIE

*Estudos*

ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA

EDIÇÃO DO INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA

Anabela Martins

**Micorrização *in vitro***  
**de plantas**  
**micropropagadas**  
**de castanheiro**  
**(*Castanea sativa* Mill)**

27

Anabela Martins

Micorrização *in vitro*  
de plantas  
micropropagadas  
de castanheiro  
(*Castanea sativa* Mill)

SÉRIE

*Estudos*

EDIÇÃO DO INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA

---

Título: Micorrização *in vitro* de plantas micropropagadas de castanheiro  
(*Castanea sativa* Mill)

Autora: Anabela Martins

Edição: Instituto Politécnico de Bragança · 1997

Apartado 38 · 5300 Bragança · Portugal

Tel. (073) 331 570 · 330 3200 · Fax (073) 25 405 · <http://www.ipb.pt>

Execução: Serviços de Imagem do Instituto Politécnico de Bragança

(d direcção gráfica, Atilano Suarez; paginação, Teresa Paradinha;

montagem, Maria de Jesus; impressão, António Cruz,

acabamento, Isaura Magalhães)

Tiragem: 500 exemplares

Depósito legal nº 74 105/94

ISBN 972-745-046-6

Aceite para publicação em 1993.

---



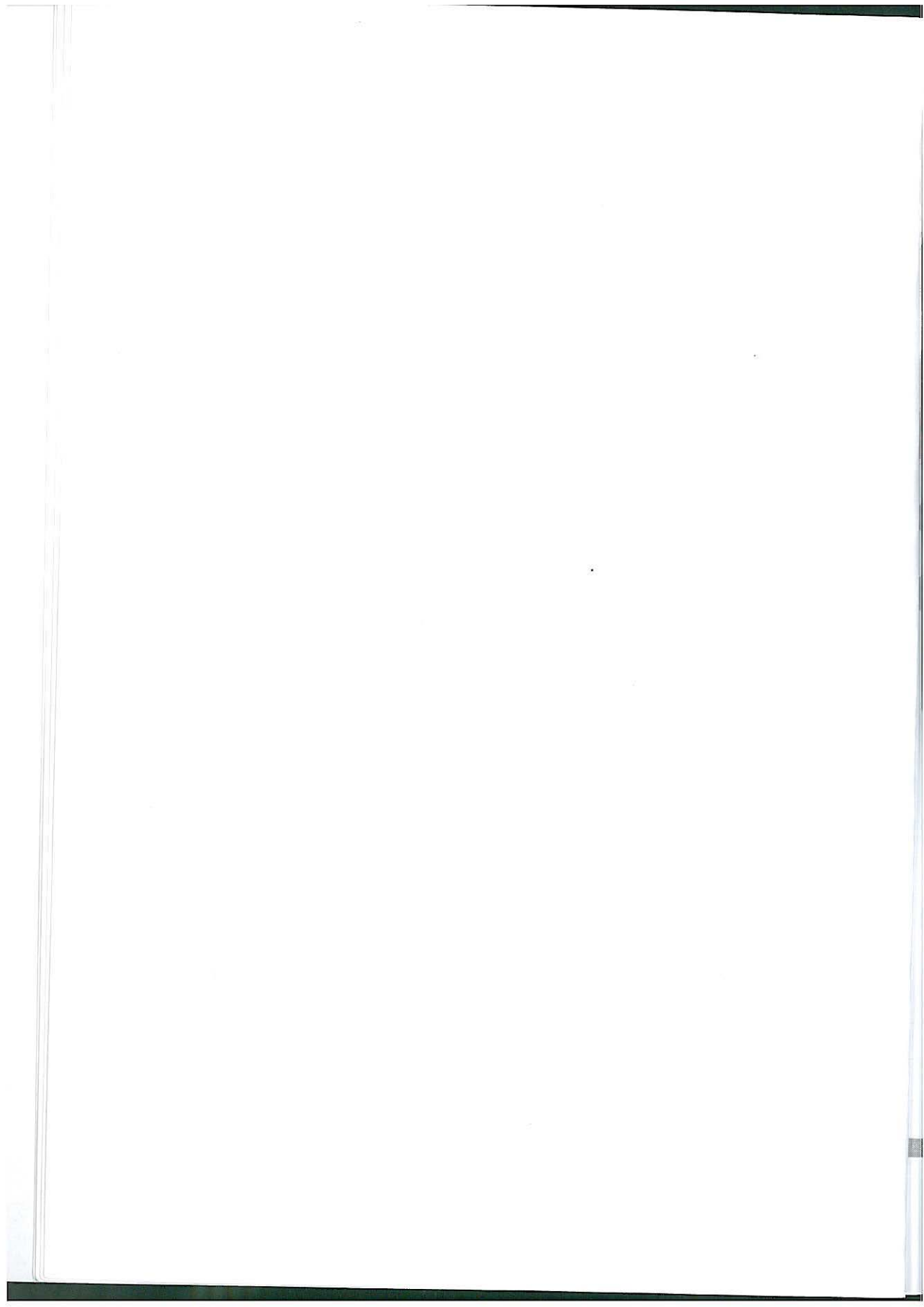
# Índice

---

Resumo	11
Abstract	13
I · Introdução	15
1 · O Castanheiro	15
2 · Micropropagação	17
3 · Micorrizas	18
3.1 · Classificação das Micorrizas	20
3.2 · Aspectos Fisiológicos da Micorrização	24
3.2.1 · Benefícios da Associação Ectomicorrízica	25
3.2.1.1 · O Fungo	25
3.2.1.2 · A Planta	25
3.2.1.2.1 · Nutrição Mineral	26
3.2.1.2.2 · Tolerância a Metais Pesados	28
3.2.1.2.3 · Resistência à Secura	30
3.2.1.2.4 · Resistência a Agentes Patogênicos	30
3.3 · Fungos Micorrízicos	32
3.4 · Ectomicorrizas de Castanheiro	33



1 · Micorrização	49
1.1 · Fase 1	49
1.2 · Fase 2	55
2 · Aclimação	56
2.1 · Fase 1	56
2.2 · Fase 2	57
3 · Parâmetros de Crescimento	58
3.1 · Crescimento em Altura	58
3.2 · Parâmetros Foliares	59
4 · Parâmetros Fisiológicos	60
4.1 · Relação Peso Seco/ Peso Fresco	60
4.2 · Proteína Solúvel	62
4.3 · Teor em Pigmentos Fotossintéticos	63
4.4 · Parâmetros Fotossintéticos e Respiratórios	64
4.5 · Actividade da RuBisCO	65
V · Discussão e Conclusões	67
Bibliografia	77



## Micorrização *in vitro* de plantas micropropagadas de castanheiro (*Castanea sativa* Mill)

### Resumo

---

A cultura de *Castanea sativa* Mill. nas zonas temperadas assume uma grande importância, quer pela produção de castanha, quer pela de madeira. A micropropagação afigura-se como uma boa técnica de propagação vegetativa, uma vez que as técnicas convencionais se revelam muito difíceis com esta espécie. A aclimação de plantas micropropagadas é normalmente, um problema que pode ser minimizado com a micorrização das raízes dessas plantas.

A micorrização *in vitro* foi induzida em germinantes e em plantas micropropagadas de *Castanea sativa* Mill, obtidas a partir de árvores adultas, pelo método de Feijó (1989), e mantidas em cultura durante cinco semanas após a indução de enraizamento.

Foram testadas quatro espécies de fungos micorrízicos: *Amanita muscaria*, *Laccaria laccata*, *Piloderma croceum* e *Pisolithus tinctorius*.

Os castanheiros foram mantidos em contacto com o fungo, sob condições axénicas, em substrato de Sphagnum, Perlite e meio MMN modificado, segundo duas metodologias: inoculação simultânea de fungo e plantas e inoculação prévia dos substratos com cada um dos fungos.

Dos fungos em ensaio, só *P. tinctorius* foi capaz de estabelecer uma associação estável com *C. sativa*. *L. laccata* e *A. muscaria* formaram um manto em cerca de 20% e 10% de raízes laterais, respectivamente.

Contudo, em *L. laccata*, o crescimento apical não foi acompanhado pela associação fúngica e *A. muscaria* não apresentou capacidade para formar rede de Hartig em muitas das raízes que exibiam manto. *Piloderma croceum* não foi capaz de estabelecer micorrização com as raízes de *C. sativa* Mill., apesar de se ter verificado ramificação dicotômica dessas raízes.

O processo de micorrização foi acompanhado por estereomicroscopia, microscopia óptica e electrónica.

Os parâmetros fisiológicos e resultados de aclimação em plantas micropropagadas de *C. sativa* Mill., foram realizados em plantas micorrizadas com *P. tinctorius*, por ter sido este o fungo que se revelou mais eficaz na micorrização

A aclimação de plantas micorrizadas foi comparada com a de plantas testemunha, em termos de sobrevivência e de crescimento (altura e área foliar). Foram ainda determinados os parâmetros fisiológicos, como teor de pigmentos fotossintéticos e de proteínas, taxas fotossintéticas e respiratórias e actividade da RuBisCO. Os valores desses parâmetros obtidos para as plantas micorrizadas indicam que a micorrização aumenta o crescimento e a produtividade, facilitando ainda o processo de aclimação das plantas micropropagadas de *Castanea sativa* Mill.

## Abstract

---

*Castanea sativa* Mill. is a very important species in temperate regions due to the production of chestnuts and wood. Micropropagation seems to be a very good technique for vegetative propagation, since conventional techniques are very difficult to use with this species. Weaning of rooted micropropagated plants is a major problem that can be minimized if these plants are mycorrhizal.

*In vitro* mycorrhization was induced on micropropagated plants of *C. sativa* Mill. obtained from adult trees following the method described by Feijó (1989), and maintained in culture for five weeks after root induction.

Four different species of mycorrhizal fungi were tested: *Amanita muscaria*, *Laccaria laccata*, *Piloderma croceum* and *Pisolithus tinctorius*.

The chestnut plants were maintained in contact with the fungi under axenic conditions using a substrate of Sphagnum, Perlite and a modified MMN medium using two different methods: simultaneous inoculation of fungus and plants or previous inoculation of substrates with the fungus.

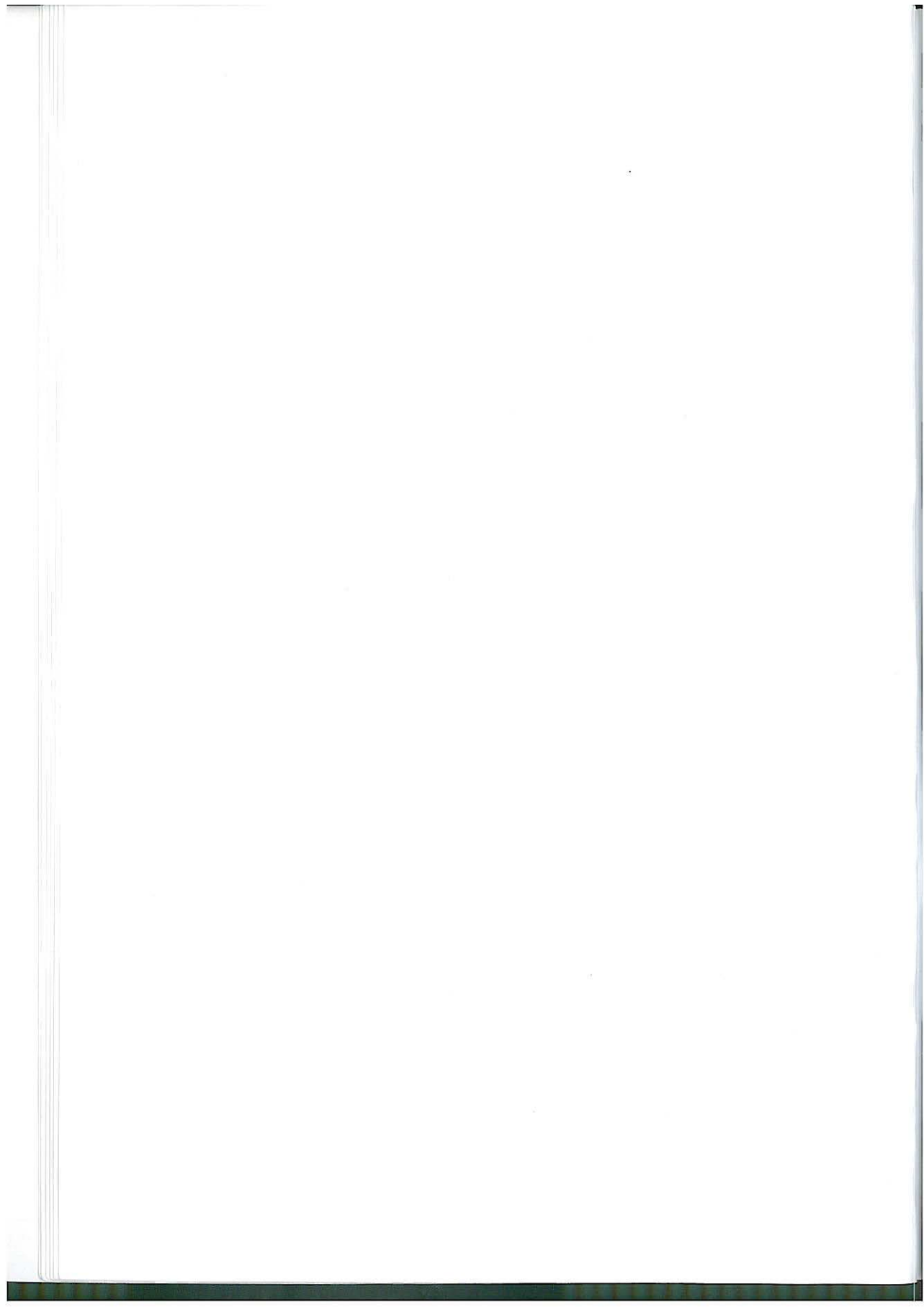
From the fungi tested only *P. tinctorius* established a stable association with *C. sativa*. *L. laccata* and *A. muscaria* formed a mantle around 20% and 10% of lateral roots respectively. However the apex growth was not followed by the fungal association. *P. croceum* was not able to establish mycorrhization with chestnut roots in spite of the dichotomous root branching that has been induced.

The mycorrhizal process was followed by stereomicroscopy and also by light and electron microscopy.

The physiological data as well as the weaning process of chestnut micropropagated plants concern the experiments with *P. tinctorius* mycorrhization.

The weaning process of mycorrhizal plants was compared with control ones in terms of survival and growth parameters (height and leaf area). Physiological parameters such as pigments and total protein contents, photosynthetic and respiratory rates and RuBisCO activity were also determined.

The results obtained for those parameters in mycorrhized plants indicate that mycorrhization increases growth and productivity and facilitates the weaning process of micropropagated plants.



# I · Introdução

---

## 1 · O Castanheiro

*Castanea sativa* Miller, o castanheiro europeu, é uma das espécies do género *Castanea* que, com os géneros *Castagnopsis*, *Fagus* e *Quercus*, constitui a família das *Fagaceae*. Ao género *Castanea*, pertencem ainda outras espécies de elevado valor económico como, *C. dentata* Borkh (castanheiro americano), *C. mollissima* Blume (castanheiro chinês) e *C. crenata* Sieb e Zucc. (castanheiro japonês), além de outros com valor económico inferior ou menos conhecido como: *C. henryi* Rehd e Wils, *C. seguinii* Dode, *C. davidii*, (provenientes da China), *C. pumila* Miller, *C. ashei*, *C. paucispina*, *C. alnifolia*, *C. floridana* Ashe e *C. ozarkensis* (provenientes do continente americano). Apresentam porte variável incluindo o arbustivo (*C. davidii*, *C. paucispina*, *C. alnifolia*), até aos 25-35 metros (*C. dentata*, *C. henryi*, *C. sativa*) (Bergougnoux & Verlhac, 1978).

O castanheiro existe na Europa desde o final da era Mesozóica, ou mais seguramente desde a era Cenozóica, época em que se deu a sua expansão (in Maia, 1988). Estudos Paleobotânicos, fazem referência a folhas fósseis idênticas às do castanheiro, do ponto de vista de nervura e recorte, tendo sido ainda identificados pólenes que remontariam a épocas anteriores às últimas glaciações (Bergougnoux & Verlhac, 1978). A implantação de *C. sativa* Mill. na Europa é tão longínqua, que é difícil distinguir os povoamentos de origem espontânea dos de origem

cultural, importados de Leste e que cresceram de alguma forma no estado selvagem (Bergougnoux & Verlhac, 1978).

Os primeiros indícios da existência de castanheiro em Portugal, remontam ao Miocénio. *C. sativa* Mill., por seu lado, é cultivada no nosso País desde o tempo dos Romanos, aparecendo nas áreas naturais do carvalho negral e do carvalho roble, oriunda da região mediterrânica oriental. Referências à sua presença, aparecem já em inquirições nos anos de 1220 e 1258, em plena idade média (Dicionário da História de Portugal *in* Maia, 1988).

A distribuição europeia do castanheiro, faz-se actualmente na Bacia Norte do Mediterrâneo, com especial incidência em Portugal, Espanha, França, Itália, Grécia, Turquia e Jugoslávia (Bergougnoux & Verlhac, 1978; Oliveira & Alves, 1987).

A cultura do castanheiro em Portugal está disseminada por todo o País, mas principalmente em Trás-os-Montes e Beira-Alta. A área total ronda os 30 000 ha (Loureiro, 1991). Há ainda algumas manchas delimitadas no Fundão, Portalegre, Monchique e Alcobaça (Monteiro Alves, 1988).

Em Portugal, o castanheiro tem uma larga distribuição, aparecendo como áreas de distribuição natural de *C. sativa* Mill., a Terra Fria de Trás-os-Montes, o Minho, Beira Baixa e as regiões de Portalegre e Monchique, ocorrendo a Norte do paralelo 39° N, na área de expansão de *Quercus robur* e *Quercus pyrenaica* (*in* Maia, 1988).

A referência à importância do castanheiro, quer como produtor de fruto, quer de madeira, é tão vasta, quanto é vasta a referência aos problemas que esta espécie tem tido ao longo do tempo. A doença da tinta causada por fungos do género *Phytophthora*, fez enormes destruições de soutos e castiçais desde finais do século XIX, havendo conhecimento da existência de outras graves crises em Itália, nos séculos XVI e XVIII, que se suspeita poderem ter sido causadas também pela doença da tinta (Bergougnoux & Verlhac, 1978).

A doença da tinta é descrita em Portugal, como tendo aparecido no Minho, em 1838, passando ao Distrito de Bragança, cerca do ano de 1900 (*in* Maia, 1988). O problema causado pela *Phytophthora*, foi abordado em 1945 por Vieira da Natividade, e mais tarde em 1961 por Fernandes, que não só tiveram a preocupação de fazer o levantamento da situação no País, como ainda de elaborar um plano tendente à sua resolução (*in* Maia, 1988).

O aparecimento ulterior do cancro de castanheiro, provocado por fungos do género *Endothia*, (importado juntamente com os castanheiros asiáticos e responsável pelo quase desaparecimento do castanheiro americano, *C. dentata*), veio agravar os problemas da cultura do castanheiro. Na Europa, foi detectada a sua presença em Itália (cerca de 1950), e depois na Suíça, França e Espanha (Vieitez *et al.*, 1986), não tendo Portugal ficado alheio, uma vez que também nos nossos Soutos surge já este problema. Depois do desaparecimento quase total (95%) do castanheiro nos Estados Unidos (*C. dentata*), a produção mundial de

fruto é essencialmente de origem europeia (Bergougnoux & Verlhac, 1978).

Várias tentativas têm sido feitas no sentido da obtenção e clonagem de variedades resistentes às doenças referidas. A existência de espécies resistentes, pertencentes ao mesmo género, tem despertado o interesse de muitos investigadores, para a criação de híbridos entre elas (*C. sativa* x *C. crenata*; *C. sativa* x *C. mollissima*), pois os híbridos são resistentes às doenças, o que não acontece com *C. sativa*. Estes híbridos, no entanto, têm problemas de adaptação edafoclimática.

A importância de trabalhos com esta espécie florestal está patente nas palavras de Maia (1988): "Reconhecida a implantação da *C. sativa* Mill, em Portugal, e, muito em especial, na Terra Fria Transmontana; considerando as áreas disponíveis a serem arborizadas com esta espécie, mais de 53921 ha, de acordo com o estudo do Grupo Coordenador do Projecto Florestal Português (1986); considerando ainda a importância que representa nos campos ambiental, social, económico, agronómico e florestal, impõe-se que os problemas suscitados pela sua cultura sejam abordados".

## 2 · Micropropagação

Conhecidas as dificuldades da multiplicação vegetativa desta espécie, por métodos tradicionais: dificuldade de enraizamento de estacas, provocado segundo Vieitez *et al.* (1981) por dois inibidores (um de crescimento e um de enraizamento, (Vieitez *et al.*, 1986)); elevada heterozigotia da semente, resultante do facto de se tratar de um género protândrico, quase completamente autoestéril, com polinização anemófila e/ou por vectores animais (Feijó, 1989), houve necessidade de recorrer a métodos não convencionais de propagação, a cultura de tecidos e órgãos *in vitro*.

A cultura de castanheiro *in vitro*, foi uma das primeiras a ser tentada em espécies lenhosas. Com efeito, Jacquot (1947) iniciou a cultura de tecido cambial de árvores adultas, tendo tido como resposta a formação de tecido indiferenciado (*calli*) (Vieitez *et al.*, 1986).

A micropropagação compreende três fases: a) estabelecimento das culturas, b) regeneração das plantas e c) transferência das plantas de cultura para o solo (Bajaj, 1986). A regeneração *in vitro* pode ser 1) **directa**, a partir de explantes como segmentos nodais, gemas, meristemas e outros, e 2) **indirecta**, com formação intermédia de *callus*. Enquanto o primeiro método assegura a manutenção dos clones, o segundo, resulta geralmente em variabilidade genética (Bajaj, 1986).

Sendo uma técnica de massificação da propagação de algumas espécies, a micropropagação é com frequência difícil de realizar, no caso das espécies florestais. Tecidos colhidos de árvores adultas, sendo preferíveis aos de material juvenil (sementes e embriões), pois o potencial genético para desenvolver as qualidades pretendidas são já conhecidas (Bonga, 1987), são também os de mais difícil implantação em cultura. Por esse motivo, Bonga (1987) recomenda que se usem

como explantes, os tecidos mais juvenis da árvore adulta seleccionada, e que se eliminem os testemunhas de correlação dos tecidos circundantes, usando o explante mais pequeno possível.

A micropropagação de plantas do género *Castanea*, tem vindo a despertar interesse crescente, havendo numerosos trabalhos neste domínio em material juvenil (Vieitez *et al.*, 1975; 1978 a, b, 1981; Vieitez & Vieitez, 1980, 1983; Biondi *et al.*, 1981; Rodriguez, 1982; San José *et al.*, 1984; Chèvre *et al.*, 1983, Strullu *et al.*, 1986; Mullins, 1987) e também em material adulto (Biondi, 1981; Chauvin *et al.*, 1988; Feijó, 1989), embora nem sempre com sucesso. Os problemas de enraizamento, frequentemente encontrados nas plantas obtidas *in vitro*, são ainda acrescidos com dificuldades de aclimação, devidas à baixa funcionalidade do sistema radicular (Bonga, 1977; Flick *et al.*, 1983).

Ultrapassadas com sucesso as primeiras dificuldades (implantação em cultura, multiplicação e enraizamento), (Feijó, 1989), havia que obviar uma segunda, a aclimação das plantas micropropagadas, de molde a reduzir as taxas de insucesso no processo de aclimação (Martins, 1992, Martins *et al.*, 1996).

### 3 · Micorrizas

As micorrizas são associações mutualísticas altamente evoluídas entre fungos do solo e raízes de plantas. Os parceiros desta associação são membros do reino *Fungi* (Basidiomycetes, Ascomycetes e Zigomycetes) e a maioria das plantas vasculares (Brundrett *et al.*, 1996). Na literatura da especialidade, o termo simbiose é frequentemente utilizado para descrever estas relações mutualísticas altamente interdependentes, nas quais a planta hospedeira recebe os nutrientes minerais, enquanto o fungo obtém compostos carbonados de origem fotossintética (Harley & Smith 1983; Harley, 1989; Brundrett *et al.* 1996; Smith & Read, 1997).

É cada vez mais reconhecido que a associação simbiótica ao nível dos organismos mais complexos é uma regra e não uma excepção. Estes sistemas mutualistas simbióticos de carácter benéfico, com uma origem relativamente recente, tais como os existentes entre algas e fungos, nos líquenes; planta e fungo nas micorrizas; algas e celenterados, nos corais; e bactérias e angiospérmicas nos nódulos fixadores de azoto, têm um papel particularmente importante nos ecossistemas naturais, e alguns podem ser de enorme importância também, nos sistemas biológicos criados pelo Homem (Harley & Smith, 1983; Smith & Read, 1997).

As primeiras descrições de associações entre fungos e plantas, devem-se a Fries (1832), que terá pela primeira vez reconhecido a natureza fúngica da camada envolvente das raízes de *Monotropa* (Hatch, 1937 *in* Barroso, 1988); e a Reissek, que em 1847 se refere à presença de hifas no interior das células de algumas angiospérmicas, e especificamente nas das *Orchidaceae* (*in* Harley & Smith, 1983). Em 1882, Kamienski descreve a associação de *Monotropa* com fungos,

referindo a formação de uma camada de hifas envolvendo as raízes. Este autor é o primeiro a afirmar que as substâncias absorvidas pela planta a partir do solo, têm necessariamente que passar pela camada de fungo que envolve as raízes (*in* Harley & Smith, 1983).

Porém, só em 1885 terá sido dada por Frank (1887), a designação de micorriza à estrutura radicular observada em espécies dos géneros *Fagus*, *Quercus*, *Castanea*, *Pinus* e *Betula*, formada por duas componentes distintas: uma zona central, constituída pela raiz propriamente dita, e uma periférica, intimamente associada àquela, constituída por hifas de fungo. Esta estrutura constituiria uma unidade funcional, semelhante a um talo de líquene. Mais tarde, Frank (1887), verificou que se formavam também micorrizas nas raízes de plantas, nas quais não se detectava a presença de fungo, apresentando-se este disperso pelo parênquima cortical da raiz (*in* Barroso, 1988; Smith & Read 1997).

Foram a partir de então reconhecidos dois grupos distintos de micorrizas: 1) **Ectotróficas**, nas quais o fungo se instala maioritariamente no exterior da raiz, constituindo o manto, e nos espaços intercelulares constituindo a rede de Hartig e 2) **Endotróficas**, em que a infecção é predominantemente intracelular. Em 1969, Peyronel *et al.* propuseram a substituição destes nomes pelos de **Ectomicorrizas** e **Endomicorrizas** substituindo o sufixo “-trófico”, dadas as conotações fisiológicas que este sugeria, para uma classificação que se referia somente a aspectos morfológicos (*in* Barroso, 1988).

O grupo das ectomicorrizas, apresenta alguma uniformidade estrutural. O grupo das endomicorrizas é muito diverso e inclui tipos estrutural e funcionalmente diferentes. Entre as ectomicorrizas inicialmente identificadas por Frank, e as endomicorrizas formadas por fungos superiores de hifas septadas, foram entretanto descobertos, tipos estruturalmente intermédios, como as **ectendomicorrizas**, que desenvolveram uma bainha extracelular e a capacidade de penetração inter- e intracelular. Estes avanços no conhecimento dos vários tipos de micorrizas existentes, levaram à necessidade de criar uma nova classificação (Harley & Smith, 1983; Smith & Read 1997).

São conhecidos os problemas de implantação de espécies florestais exóticas em habitats onde não existiam antes (Harley, 1986). A taxa de inviabilidade de sementes de lenhosas em viveiro, é também muito elevada, sendo ainda conhecido o acréscimo de viabilidade das mesmas, em solos provenientes de regiões onde existem implantadas plantas da mesma espécie ou espécies afins. Este conhecimento, aliado ao conhecimento do estado de micorrização da maioria das espécies florestais em condições naturais, levou a pensar que a ausência de micorrização, poderia ser, em qualquer destes casos, a causa da inadaptação ou inviabilidade das plantas. Com efeito, a inoculação de fungos micorrízicos nos solos dos viveiros, ou dos terrenos para implantação de espécies exóticas, parece ser altamente favorável ao acréscimo de sucesso das fases referidas.

A micorrização aparece, deste modo, como uma situação que proporciona condições mais favoráveis ao desenvolvimento de algumas

plantas. As plantas obtidas *in vitro*, possuindo um sistema radicular frequentemente pouco funcional na absorção de água e nutrientes (Bonga, 1977; Evans *et al.*, 1983), poderiam numa primeira fase de adaptação às condições *ex-vitro* ter a sua sobrevivência facilitada pela associação precoce das suas raízes com um fungo micorrízico (Martins, 1992; Martins *et al.*, 1996).

### 3.1 · Classificação das Micorrizas

A classificação aqui apresentada, é a adoptada por Harley & Smith (1983) e Smith & Read (1997). Segundo estes autores trata-se de uma classificação que não pretende estabelecer relações morfofuncionais entre os diferentes grupos de micorrizas, pois estas, na maioria dos casos, não são suficientemente conhecidas, para que se possam usar como característica de classificação. Classificações de micorrizas baseadas em relações morfofuncionais foram propostas por Lewis (1973, 1975) e por Read (1983) e correspondem também à apresentada no **quadro 1**. Neste quadro são ainda apresentadas algumas características de cada um dos grupos, assim como os *taxa* dos hospedeiros em que ocorrem e o grupo de fungo que as constituem.

**Quadro 1 – Classificação das micorrizas.** As características estruturais, referem-se ao estado de maturação e não ao estado de desenvolvimento ou senescência (Harley & Smith, 1983; Smith & Read, 1997).

	Hifa	Etand.	Ves.Arb.	Ficoids	Arbúsc.	Monotropits	Orquíds
septados	+	+	-	+	+	+	+
Fungos							
aseptados	(+)	-	+	-	-	-	-
Hifas intracelulares	-	+	+	+	+	+	+
Presença de manto	+	+ ou -	-	-	+	+	-
Rede de Hartig	+	+	-	-	+	+	-
Enrolamentos intracelulares	-	+	+	+	+	-	+
dicotômicos	-	-	+	-	-	-	-
Haustórios não dicotômicos	-	-	-	-	-	+	+ ou -
Vesículas (células/tecidos)	-	-	+ (ou -)	-	-	-	-
Aclorofilia	-	-	- (ou +)	-	- (ou +)	+	+
<i>Taxa</i> fúngicos	Basídeo Asco Fico	Basídeo Asco?	Fico	Asco (Basídeo)	Basídeo	Basídeo	Basídeo
<i>Taxa</i> do hospedeiro	Gímno Angio	Gímno Angio	Brio Pterid Gímno Angio	<i>Eicetes</i>	<i>Eicetes</i>	<i>Monotropide</i>	<i>Orquídeas</i>
Ves-Arb.- Vesiculares -arbusculares			Fico- <i>Hiomycetæ</i>			Brio- <i>Bryophyta</i>	
Ecto- Ectomicorrizas			Asco- <i>Ascomycetæ</i>			Pterido- <i>Pteridophyta</i>	
Ectendo.-Ectendomicorrizas			Basídeo- <i>Basidomycetæ</i>			Gímno- <i>Gymnospermae</i>	
						Angio- <i>Angiospermae</i>	

### Ectomicorrizas

O tipo ectomicorrizas foi o primeiro a ser descrito, dada a maior facilidade de visualmente ser observada a sua presença. As primeiras descrições destas micorrizas, no entanto, não foram inicialmente consideradas como uma associação com um fungo. Em 1840, Hartig descreve pela primeira vez ectomicorrizas em *Pinus*, não reconhecendo, no entanto, a natureza fúngica do manto que considerou como uma periderme persistente. A rede de hifas intercelulares observada, foi por ele interpretada como uma estrutura peculiar da parede celular (Hartig, 1840 *in* Barroso, 1988).

A maioria das ectomicorrizas observadas, apareciam em espécies florestais das famílias *Pinaceae*, *Betulaceae* e *Fagaceae*, ocorrendo em regiões temperadas do hemisfério norte. Sabe-se hoje que também as plantas das regiões tropicais e subtropicais apresentam ectomicorrizas (Dudridge, 1980 *in* Barroso, 1988), sobretudo em áreas em que, por razões edafoclimáticas, a actividade vegetativa se restringe a um determinado período do ano. Outras famílias de regiões tropicais húmidas da Indo-Malásia, como a *Dipterocarpaceae*, apresentam micorrizas em todas as suas espécies (Harley & Smith, 1983).

As ectomicorrizas são caracterizadas por: 1) uma bainha fúngica ou **manto**, que envolve a raiz incluindo o ápice, e 2) uma **rede de Hartig** que é um complexo de hifas que penetram através da epiderme da raiz, e envolvem as células corticais. As hifas normalmente não penetram nas células. O manto tem uma espessura variável entre os 20 e os 100 µm, sendo a espessura mais frequente, da ordem dos 30-40 µm, o que constitui 25-40% do peso seco da estrutura micorrízica (Harley & Smith, 1983).

O manto pode apresentar-se liso e sem hifas de ligação ao solo, ou profusamente ligado a hifas extra-radiculares que o ligam ao solo. As raízes infectadas não apresentam pêlos radiculares (Cooke, 1977 *in* Barroso, 1988), e apresentam em *Pinus*, ramificações dicotómicas, também descritas noutras espécies, podendo adquirir, por ramificação sucessiva, uma conformação coralóide (Rancillac, 1983) ou piramidal.

As células epidérmicas e corticais mais externas das raízes infectadas apresentam, frequentemente, um alongamento radial (alongamento transversal oblíquo), que confere à raiz um diâmetro superior ao das raízes não micorrizadas correspondentes. Segundo Clowes (1951), este alongamento resulta do *stress* provocado pelo acréscimo de calibre dos vasos xilémicos sem o concomitante crescimento do córtex e da epiderme (*in* Harley & Smith, 1983).

As plantas que formam ectomicorrizas possuem, de um modo geral, dois tipos de raízes: as que têm um ilimitado potencial de crescimento (raízes longas), e as que possuem crescimento e tempos de vida limitados (raízes curtas). Quando a maioria das raízes que formam o sistema radicular, são ramificações laterais de crescimento limitado, trata-se de um sistema heterorrízico (Harley & Smith, 1983). Todos os ápices crescem durante um determinado período, e todos podem ser infectados, de tal modo, que todo o sistema radicular é potencialmente

micorrízico na maioria das espécies que formam ectomicorrizas. A micorrização de raízes longas e curtas difere apenas no grau de micorrização (Harley & Smith, 1983), apesar de alguns autores, considerarem a micorrização de raízes longas como um acontecimento excepcional (*in* Barroso, 1988). Os ápices, completamente envolvidos por um manto fúngico, são infectados logo que emergem do córtex da raiz principal. São habitualmente curtos, não possuem coifa, e continuam a crescer lentamente, dando origem a um sistema de ramificações racemosas. Os que, por outro lado, não são completa e permanentemente envolvidos por um manto fúngico, ou que se mantêm não infectados, continuam o seu crescimento activo, e são os ápices responsáveis pelo crescimento radicular, ou podem ficar dormentes e abortar (Harley & Smith, 1983).

As raízes longas que possuem ramificações laterais micorrizadas, a intervalos regulares, apresentam frequentemente rede de Hartig, que se desenvolve até 5-10  $\mu\text{m}$  do ápice da raiz, não possuindo na maioria dos casos manto evidente. As células do parênquima cortical das raízes infectadas, têm longevidade superior à das células das raízes não infectadas (*in* Barroso, 1988).

Uma característica marcante das raízes micorrizadas é o seu crescimento lento, em contraste com as raízes não infectadas (Harley & Smith, 1983; Smith & Read, 1997). A infecção do sistema radicular é permanente, muito embora, as micorrizas em si, possam ter longevidade curta (de alguns anos ou meses). Chilvers & Gust, (1982 a, b) ao compararem o crescimento de raízes de eucalipto micorrizadas e não micorrizadas, verificaram que, para raízes da mesma categoria hierárquica, o crescimento é cerca de cinco vezes superior em raízes não micorrizadas. No entanto importa realçar que, apesar das raízes micorrizadas crescerem mais lentamente apresentam, um crescimento contínuo, estável, enquanto as não micorrizadas, crescem muito rapidamente nos períodos de crescimento intenso, parando de crescer nos restantes períodos (Harley & Smith, 1983; Smith & Read, 1997).

Tal como ficou dito, a diferenciação das raízes faz-se em órgãos de dois tipos: os responsáveis pelo crescimento (os eixos principais da raiz, sobretudo quando não infectados), e os responsáveis pela absorção, as micorrizas (raízes laterais, maioritariamente infectadas). As raízes principais, mesmo quando envolvidas por um manto, podem, em determinados períodos, rompê-lo na região apical, e retomar o crescimento activo até que o fungo consiga envolvê-la de novo. O mesmo pode acontecer com algumas raízes laterais de maior diâmetro. As micorrizas de ordem hierárquica inferior, nunca rompem o manto, crescendo simultaneamente com o fungo (Harley & Smith, 1983).

No sentido de avaliar quais os factores que influenciam a micorrização, têm vindo a ser realizados estudos *in vitro*, dadas as dificuldades que apresentam as abordagens da micorrização em condições naturais. Os métodos de síntese axénica porém, encontraram muitos críticos e opositores, que achavam que estes poderiam, de algum modo, interferir nos resultados. O facto de se eliminarem as interações com outros organismos do solo, e de, em muitos casos, se fornecer uma

fonte de carbono para permitir o crescimento do fungo antes da infecção; e ainda de se proceder à esterilização do substrato, poderiam criar alterações, determinantes da eficiência e tipo de infecção (Piché & Peterson, 1988). Por este motivo procedeu-se, em paralelo, a estudos usando métodos não axénicos, como o de Fortin *et al.* (1980), descrito por Piché *et al.* (1982). Com estes métodos foi possível demonstrar que, não há diferenças significativas entre as ectomicorrizas sintetizadas em condições axénicas e não axénicas (Piché & Peterson, 1988).

A diferença entre a síntese axénica e não axénica reside, sobretudo, no tempo de infecção (Duddridge *et al.* 1984). No sistema estudado, esta era iniciada às três semanas e completada, entre as 6-8 semanas (sistema axénico); enquanto, em solo natural, era retardado para as 11 e 19 semanas respectivamente. Segundo os mesmos autores (1984b), só existem diferenças morfológicas nas micorrizas obtidas em sistema axénico quando se usam meios com quantidades elevadas de fonte de carbono, constatando-se haver alterações na interface fungo-hospedeiro, com deposição de calose nas paredes. Esta formação parece dever-se a uma resposta do hospedeiro à infecção, em consequência do excedente de carbono.

Os sistemas não axénicos permitiram estudar com detalhe o processo de colonização da raiz pelo fungo (Fortin *et al.*, 1983). A ligação do fungo à epiderme da raiz do hospedeiro parece dever-se à secreção de polissacáridos por parte desta (Nylund, 1980). Com efeito, a chegada de produtos da fotossíntese à raiz provoca um aumento da concentração de compostos de carbono nos exudados. Estes são basicamente constituídos por aminoácidos, proteínas, glúcidos, ácidos orgânicos e fitorreguladores. As condições ambientais, nomeadamente o balanço mineral e as concentrações de fitorreguladores, interferem directamente na permeabilidade celular, criando um controlo por retroacção que, de alguma forma, parece estar relacionado com o mecanismo de ligação do fungo às raízes, quando da infecção micorrízica (Barea, 1986).

Não há consenso quanto à causa da dicotomia das raízes curtas. Segundo Rupp & Mudge, (1985) a produção de etileno (produzido pelas raízes como resposta às auxinas do fungo), causa a dicotomia das raízes, a inibição de crescimento de pêlos radiculares e o alongamento radial das células epidérmicas. Estes resultados são apoiados pelo facto da aplicação de um inibidor da acção do etileno provocar uma inibição de cerca de 35% na resposta da auxina (Rupp & Mudge, 1985). Barea, (1986) sugere que o efeito das auxinas se deve à inibição das auxina-oxidases, provocada pelo fungo. Este potenciaria a acção das auxinas pelo impedimento da sua degradação. Por outro lado, Faye *et al.*, (1980), verificaram a dicotomia de raízes de *Pinus pinaster* na ausência de qualquer fungo ou fitorregulador. Slinkis (1948-1958), demonstrou que a morfologia das raízes micorrizadas (produção de raízes laterais, estrutura dicotómica e inibição dos pêlos radiculares), era devida à acção das auxinas produzidas pelos fungos, pois a aplicação de filtrados de fungo em raízes, produzia o mesmo efeito que a

micorrização, o mesmo acontecendo com a aplicação de auxinas puras às raízes (Harley & Smith, 1983). Conhece-se há muito a produção de ácido indol acético (IAA) por fungos, sabendo-se que, em cultura, se dá por desaminação oxidativa do triptofano presente no meio. Esta é também a forma pela qual, os fungos micorrízicos formam os compostos indólicos, que produzem quando cultivados em meios contendo triptofano. A produção de IAA por fungos ectomicorrízicos foi demonstrada em numerosos trabalhos, tendo sido confirmada em *Pisolithus tinctorius* por técnicas analíticas de grande rigor (cromatografia em camada fina, cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), imunoensaio com anticorpos monoclonais (ELISA) e cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS)), (Frankenberger & Poth, 1987). Verificou-se que a produção de auxinas em cultura, está dependente da presença de triptofano como fonte de azoto, havendo diminuição da produção, quando existem fontes de mais imediata utilização, ainda que na presença deste (Harley & Smith, 1983; Frankenberger & Poth, 1987). A produção de auxinas é muito variável entre os fungos ectomicorrízicos, mas pensa-se que é maior nestes que na maioria dos fungos de outros grupos ecológicos (Harley & Smith, 1983). A quantidade de auxinas produzidas varia, não só com a velocidade da reacção de desaminação oxidativa do triptofano, como ainda com a presença de enzimas que oxidam ou destroem os compostos indólicos e com a presença de fenóis ou outras substâncias que inibam estas enzimas (Harley & Smith, 1983). Segundo Gay (1986), estes compostos são sintetizados em cultura em menor quantidade quando a concentração de glucose é elevada. Gay et al. (1994) verificaram ainda que a micorrização com estirpes de *Hebeloma cylindrosporum* superprodutoras de IAA apresenta diferenças, nomeadamente na espessura da rede de Hartig. As estirpes superprodutoras de IAA, induzem a formação de uma rede de Hartig muito espessa, composta por camadas multiseriadas de células de fungo, enquanto as estirpes selvagens, induzem uma rede de Hartig monoseriada. Há indícios de uma relação entre a formação da rede de Hartig e a produção de auxinas.

### 3.2 · Aspectos Fisiológicos da Micorrização

Uma das consequências fisiológicas da micorrização é o maior vigor das plantas, sobretudo se estas se desenvolvem em solos muito pobres. Parece existir uma relação entre o grau de infecção das raízes, e a natureza do solo. Nos solos com baixos teores em sais minerais, a infecção é mais intensa (Hayman, 1983).

Em relação às ectomicorrizas, referir-nos-emos a dois aspectos da relação trófica hóspede/hospedeiro: O Fungo- fonte de carbono e benefícios ; A Planta- benefícios específicos que o estado de ectomicorrização lhes confere.

### 3.2.1 · Benefícios da Associação Ectomicorrízica

#### 3.2.1.1 · O Fungo

A convicção de que a planta hospedeira fornece a fonte de carbono ao fungo, é aceite desde o reconhecimento das primeiras micorrizas por Frank (1885) (Harley & Smith, 1983; Smith & Read, 1997). Experiências ulteriores, demonstraram uma correlação entre a intensidade luminosa e a concentração de carboidratos no sistema radicular. Por outro lado a translocação de compostos de carbono marcados, após fornecimento de  $^{14}\text{CO}_2$ , confirmou serem as plantas hospedeiras a fonte de, pelo menos, parte destes compostos (Harley & Smith, 1983; Smith & Read, 1997).

A suplementação do meio de produção das micorrizas com diversos açúcares, mostrou que a glucose e a frutose são rapidamente absorvidas pelas micorrizas, embora a glucose o seja mais rapidamente. A sacarose é hidrolisada por uma enzima associada à parede do fungo, sendo a glucose preferencialmente absorvida de entre os subprodutos. A velocidade de absorção das hexoses é dependente da temperatura e níveis de oxigénio, e é inibida pelos inibidores da citocromo-oxidase e da fosforilação oxidativa. Durante a absorção de carboidratos a respiração das micorrizas é acelerada o que demonstra que a absorção é um processo metabolicamente dependente, no qual ocorre um passo de fosforilação (Harley & Smith, 1983; Smith & Read, 1997).

A análise dos tecidos, depois da tomada dos carboidratos, revela que as hexoses absorvidas são rapidamente convertidas noutros compostos. As micorrizas apresentam como compostos de reserva, carboidratos característicos dos fungos e característicos das plantas. Glucose e frutose são comuns aos dois, enquanto que a trealose, manitol e glicogénio são característicos dos fungos; e a sacarose e amido aparecem no hospedeiro. Sendo a trealose e o manitol muito fracamente absorvidos pelos tecidos vegetais, o armazenamento dos carboidratos no fungo micorrízico sob esta forma e sob a forma de glicogénio, previne o fluxo destes para os tecidos do hospedeiro (Harley & Smith, 1983).

#### 3.2.1.2 · A Planta

Os fungos ectomicorrízicos beneficiam diversamente as plantas hospedeiras segundo mecanismos pouco conhecidos. Pela importância que apresentam podemos destacar: 1) o aumento da nutrição mineral, nomeadamente de fósforo, azoto e potássio; sobretudo em condições de carência, como acontece em solos pobres (Ashford *et al.*, 1975; Mejstřík, 1975; Harley & Smith, 1983; Lapeyrie *et al.*, 1984; Rolin *et al.*, 1984; Martin *et al.*, 1985; Ronald & Söderhäll, 1985; Ingestad *et al.*, 1986; Bougher *et al.*, 1990; Cumming & Weinstein, 1990; Jones *et al.*, 1990; Scheromm *et al.*, 1990 a, b); 2) aumento da tolerância a metais pesados (Brown & Wilkins, 1985; Väre, 1990); 3) acréscimo de resistência à secura (Harley & Smith, 1983; Feil *et*

*al.*, 1988; Smith & Read, 1997); 4) aumento da resistência a infecções por agentes patogénicos (Marx, 1969, 1970, 1972, 1973, 1974; Marx & Davey, 1969 a, b; Azevedo, 1973; Perrin & Garbaye, 1983; Vrot & Grente, 1985; Duchesne *et al.*, 1988; Mayer, 1988).

### 3.2.1.2.1 · Nutrição Mineral

**Absorção de Compostos de Azoto** - Os fungos ectomicorrízicos são capazes de utilizar azoto sob a forma de amónio ( $\text{NH}_4$ ). Alguns são também capazes de usar aminoácidos e outros compostos orgânicos de azoto simples. Os habitats da maioria das espécies ectomicorrízicas não possuem nitratos disponíveis no solo em quantidades significativas. Isto está relacionado com os baixos valores de pH, e com a presença de compostos fenólicos no solo que inibem o crescimento dos organismos capazes de oxidar o amónio a nitratos. As ectomicorrizas crescem preferencialmente nas camadas húmicas com valores de pH muito baixos, onde as fontes de azoto disponíveis são o amónio, compostos orgânicos azotados simples e compostos azotados complexos, frequentemente insolúveis (Harley & Smith, 1983; Smith & Read, 1997).

Os compostos azotados complexos revelaram-se pouco satisfatórios como fonte de azoto para as micorrizas. Verificou-se que as hifas extra-radiculares das ectomicorrizas, absorvem azoto sob a forma de amónio e glutamina e os translocam para as raízes das plantas que infectam. Será importante ter em conta que a competição pelos compostos azotados disponíveis nos solos húmicos é muito grande, enquanto a quantidade de compostos utilizáveis como fonte de carbono pelos fungos é muito reduzida. Os fungos micorrízicos, tendo como fonte de carbono a planta hospedeira, estão em grande vantagem sobre os restantes (Harley & Smith, 1983; Smith & Read, 1997).

A absorção de amónio está metabólicamente relacionada com o suprimento de compostos de carbono, os quais são, em parte, utilizados na produção de aminoácidos a partir deste. Nos tecidos, somente uma pequena parte do amónio absorvido, permanece sob esta forma; cerca de 90% é transformado directamente em compostos orgânicos. Os carboidratos provenientes da planta são essenciais para a tomada de amónio por parte das micorrizas. Quando se fornece glucose ou frutose, antes ou simultaneamente à adição de amónio, a absorção deste é consideravelmente aumentada. No entanto se os aplicarmos sem adição de amónio, são convertidos em açúcares de reserva (trealose, glicogénio), o que significa, segundo Carrodus (1967), que o fungo cria uma reserva a utilizar na síntese de compostos orgânicos quando da disponibilização de amónio (Carrodus, 1965, 1966, 1967 *in* Harley & Smith, 1983).

A translocação de compostos de carbono do hospedeiro para o fungo não pode ser considerada como um fornecimento unilateral de compostos de carbono pela planta, mas também como um mecanismo de troca entre a planta e o fungo (Finlay, 1992). Os compostos de carbono, maioritariamente sacarose, deslocam-se da planta para o manto onde são rapidamente convertidos em intermediários metabóli-

cos como a trealose e o manitol (Söderström et al., 1988). A assimilação de azoto pelo fungo, com incorporação nesses intermediários metabólicos para formar aminoácidos é, segundo alguns autores, um dos mecanismos de troca entre hóspede e hospedeiro, sendo também responsável pelo aumento da produtividade em plantas micorrizadas (Finlay, 1992, Finlay et al., 1996).

A absorção de amónio por parte das micorrizas estimula a respiração destas, sobretudo após terem estado privadas de nutrientes por um período mais ou menos longo. Simultaneamente ocorre a estimulação da fixação de CO<sub>2</sub> durante a fase escura, em compostos como a glutamina e o ácido glutâmico. A aplicação de amónio provoca um aumento da tomada de O<sub>2</sub>, da libertação de CO<sub>2</sub>, e da mobilização dos fosfatos. Isto pressupõe necessidades energéticas, para biossíntese de aminoácidos e suas amidas, cujos radicais carbonados serão provenientes da via glicolítica e da fixação de CO<sub>2</sub> (Harley & Smith, 1983).

Muitos autores referiram a incapacidade das micorrizas absorverem e reduzirem nitratos. Em 1972, Smith verificou que a velocidade de absorção de nitratos pelas micorrizas é idêntica à de absorção de cloretos, e muito inferior à absorção de amónio. Segundo Bigg (1981), embora as micorrizas consigam reduzir os nitratos, estes provocam um efeito inibitório directo do seu crescimento.

As espécies que colonizam solos calcários utilizam nitratos como fonte de azoto, pois este é o principal composto azotado disponível (Scheromm et al., 1990). Nestas circunstâncias, a presença de ectomicorrizas diminui os sintomas de deficiência em azoto comparativamente com as plantas não micorrizadas. Pensa-se que nas plantas ectomicorrizadas, o fungo pode ter um duplo papel de absorção e redução de nitratos e que este é, no entanto, variável com as espécies. Um número considerável de espécies fúngicas, apresentam capacidade de se desenvolver na presença de nitratos, possuindo uma das enzimas de maior importância na redução destes compostos, a nitrato redutase (Plassard et al., 1984; Scheromm et al., 1990).

As ectomicorrizas apresentam ainda capacidade de usar compostos orgânicos, como o glutamato, o aspartato e as suas amidas como fonte de azoto. Embora se conheça a existência de amidases ligadas às paredes de alguns fungos, não há qualquer indicação da existência destas enzimas, nas micorrizas (Harley & Smith, 1983; Scheromm et al., 1990).

**Absorção de Fosfatos** - O fósforo é um dos elementos limitantes do crescimento das plantas. As ectomicorrizas absorvem fosfatos do solo de forma mais eficiente que as raízes não micorrizadas (Bougher et al, 1990; Jones et al, 1990, 1991), chegando a atingir-se naquelas, níveis de absorção nove vezes superiores (Ashford et al., 1975). Estas diferenças são tanto mais significativas, quanto mais próximo se estiver da concentração em que este elemento se torna limitante do crescimento (Lapeyrie et al., 1984; Bougher et al., 1990), verificando-se mesmo nalguns casos, que em concentrações não limitantes, o efeito da micorrização no crescimento das plantas é pouco

significativo (Bougher *et al.*, 1990).

Os fosfatos absorvidos pelas raízes não infectadas são translocados imediatamente através da planta, enquanto a maioria do fosfato absorvido pelas raízes micorrizadas, é retido no manto e translocado depois, lentamente, para os tecidos da planta. Este fosfato é armazenado nos vacúolos das células do fungo sob a forma de polifosfatos (Ashford *et al.*, 1975). O ortofosfato absorvido é deste modo, armazenado sob a forma de polifosfato, constituindo grânulos metacromáticos (Lapeyrie *et al.*, 1984). Esta capacidade de armazenamento de polifosfato nos vacúolos parece ser uma capacidade geral dos fungos e não somente dos fungos em associação micorrízica. Nos fungos estudados em cultura pura, o polifosfato é uma das formas de fósforo que sofre maior variação, como resposta à disponibilidade deste elemento no meio (Lapeyrie *et al.*, 1984). Sabe-se no entanto, que o fosfato absorvido pelos fungos ectomicorrízicos em cultura pura, é armazenado primeiramente sob a forma de ortofosfato, sendo cerca de 3-17% do fosfato total, transformado em polifosfato subsequentemente (Rolin *et al.*, 1984). Os polifosfatos parecem ter importância fundamental no processo simbiótico pois nas micorrizas, estes compostos constituem cerca de 30% dos fosfatos totais, contra os 9% encontrados por Rolin e colaboradores (1984), nos fungos em cultura pura.

Nas ectomicorrizas, os níveis de fosfatases são superiores aos que se encontraram para as raízes não micorrizadas o que, certamente, lhes confere maior capacidade de utilização das fontes de fosfato disponível no solo (Doumas *et al.*, 1986; Jones *et al.*, 1990). A baixa mobilidade dos fosfatos no solo, levou Jones e colaboradores (1990), a estudarem o papel das hifas extrarradiculares na absorção destes compostos pois estas devem ter um papel importante no mecanismo de absorção. Segundo estes autores, a absorção de fosfatos não está apenas relacionada com a extensão da micorrização, mas também com a extensão de hifas extrarradiculares associadas ao sistema. Dá-se maior absorção de fosfatos nas micorrizas que apresentam quantidades mais elevadas de hifas extrarradiculares (Jones *et al.*, 1990).

O papel das ectomicorrizas, não se resume a uma maior efectividade na absorção de fosfatos disponíveis em quantidade limite. Possuem ainda capacidade para mobilizar fontes de fosfatos sob formas não disponíveis, como os fosfatos insolúveis, dos quais o fosfato de alumínio ( $\text{AlPO}_4$ ) é um exemplo estudado (Cumming & Weinstein, 1990). Plantas não micorrizadas apresentam níveis muito baixos de fosfatos e baixo desenvolvimento das folhas em presença de  $\text{AlPO}_4$ , enquanto as plantas micorrizadas apresentam níveis de fosfatos e desenvolvimentos normais. A mobilização desta fonte de fosfatos está associada, segundo Cumming & Weinstein, (1990), a uma extrusão de prótons que aumenta a sua solubilidade.

### 3.2.1.2.2 · Tolerância a Metais Pesados

O mecanismo associado à mobilização de  $\text{AlPO}_4$ , confronta-

nos com um outro papel das micorrizas, o de tolerância a elementos tóxicos. Com efeito o alumínio é um elemento fitotóxico, mesmo nos níveis encontrados em solos moderada a elevadamente ácidos. Este mecanismo de toxicidade, parece estar relacionado com interações entre o alumínio e o fósforo, estando envolvidas regulações enzimáticas, relacionadas com a absorção deste último. A matriz do apoplasto da raiz, apresenta-se carregada negativamente, ligando-se aos íões  $Al^{3+}$  altamente electropositivos. O alumínio complexa-se com o fósforo, reduzindo a sua disponibilidade para ser absorvido pelas plantas (Cumming & Weinstein, 1990).

Uma vez que as plantas ectomicorrizadas mantêm as concentrações foliares de fósforo em níveis normais, quando em solos com níveis elevados de Al, podem admitir-se dois mecanismos de desintoxicação mediada pelas micorrizas: 1) a acidificação da rizosfera por dissociação de ácidos orgânicos excretados, ou por elevação dos níveis de protões no meio, (associados ao uso preferencial de nitratos como fonte de azoto), pode aumentar a disponibilidade de fósforo por solubilização de sais inorgânicos metalo-fosfatados; 2) a excreção de compostos orgânicos pelo fungo simbionte, pode dissolver os precipitados metalo-fosfatados com formação de complexos organo-alumínicos solúveis. Qualquer dos dois mecanismos aumentaria a disponibilidade de P e os quelatos formados seriam os responsáveis pela desintoxicação (Brown & Wilkins, 1985; Cumming & Weinstein, 1990).

Donner & Heyser (1989), referiram a ligação de Al às paredes do fungo e ao lúmen das hifas do manto de ectomicorrizas de *Betula* (*in Väre*, 1990). Este mecanismo foi também verificado nas paredes das células das plantas que apresentam tolerância ao zinco (Brown & Wilkins, 1985). O Al lumínico parece estar associado aos grânulos de polifosfato armazenados no fungo, o que conferiria ao polifosfato um papel adicional de desintoxicação associado ao papel que lhe é habitualmente atribuído, de reserva de fósforo numa forma osmoticamente inactiva (*Väre*, 1990).

O mecanismo de desintoxicação proposto para o alumínio, foi anteriormente proposto por Brown & Wilkins, (1985) para o zinco. Segundo estes autores, as plantas ectomicorrizadas de *Betula* apresentam translocações de Zn inferiores às não micorrizadas, havendo uma elevada concentração deste elemento ao nível das hifas. O aumento de absorção de minerais, que se observa em plantas micorrizadas, verificando-se também, para elementos tóxicos, é acompanhado por um papel regulador por parte do fungo que os acumula impedindo a sua translocação para a planta (Brown & Wilkins, 1985).

Estes mesmo resultados foram verificados ainda para o cádmio (Cd), níquel (Ni) e chumbo (Pb), que se detectaram em baixas concentrações nos germinantes micorrizados de *Quercus rubra* com *Suillus luteus* e em elevadas concentrações nas ectomicorrizas. Os germinantes não micorrizados, exibiam deficiências em micro- e macronutrientes (Dixon, 1988). Importa referir neste caso que a colonização ectomicorrizica foi significativamente diminuída nas sementes de

*Quercus* pela presença destes metais pesados, sobretudo Cd e Ni (Dixon, 1988).

### 3.2.1.2.3 · Resistência à Secura

O desenvolvimento das micorrizas é favorecido por uma humidade moderada do solo, que permita um bom arejamento, enquanto a secura é desfavorável ao desenvolvimento de ectomicorrizas. Em 1935, Cromer verificou que as plantas micorrizadas são mais resistentes à secura que plantas não micorrizadas, tendo Harley, em 1940, confirmado estes resultados (Harley & Smith, 1983). Muitos outros trabalhos foram feitos neste domínio (Duddridge et al., 1980; Boyd et al., 1986; Meyer, 1987; Feil et al., 1988; Marx and Cordell, 1989; Guehl et al., 1992).

Segundo Meyer (1987), *Cenococcum geophyllum* é uma das espécies de fungo que confere maior resistência ao stress hídrico, sendo significativamente superior à conferida pelas ectomicorrizas designadas de hialinas. Feil et al., (1988), verificaram o retardamento do crescimento das raízes longas e o estímulo da ramificação lateral das raízes micorrizadas de *Picea abies* em condições de secura.

A presença de rede de Hartig aumenta a resistência das raízes micorrizadas à secura, sendo a quantidade de hifas extrarradiculares determinante nessa mesma resistência. As hifas extrarradiculares mantêm-se funcionais mesmo em condições drásticas de secura, continuando a absorver fosfatos, azoto e potássio do solo. Em condições menos pronunciadas de secura a absorção destes nutrientes nas raízes não micorrizadas, é muito mais afectada (Hu, 1977, Harley & Smith, 1983).

### 3.2.1.2.4 · Resistência a Agentes Patogénicos

Em 1950 Pierre Venot observou que, castanheiros que possuem as raízes cobertas por filamentos brancos ou rosados, (atestando o seu estado de micorrização), eram raramente atacadas pela doença da tinta (*Phytophthora cinnamomi*) (Bergougnoux & Verlhac, 1978). Cerca de vinte anos mais tarde, foi verificado que a doença das folhas curtas, causada em *Pinus echinata* também por *Phytophthora cinnamomi*, poderia ser totalmente evitada se as raízes das plantas estivessem micorrizadas com fungos pertencentes aos Basidiomicetos; e em particular com *Leucopaxillus cerealis* (Marx, 1970, Marx & Davey, 1969 a, b).

Tendo em conta este conhecimento, as ectomicorrizas aparecem com um significado ecológico alargado, para além da sua função fisiológica de benefício do crescimento da planta, para incluir um papel de protecção contra agentes patogénicos que infectam as raízes (Marx, 1972; 1974; Azevedo, 1973; Perrin, 1985).

Marx (1972) refere vários trabalhos que atestam estes resultados, quer em condições axénicas, quer em condições naturais. Sementes de pinheiro, micorrizadas com *Pisolithus tinctorius*, apresentam taxas de sobrevivência superiores quando infectadas com o fungo

patogénico *Rhizoctonia solani*. Germinantes de *Picea mariana*, quando micorrizados com *Suillus granulatus* apresentam bom crescimento em presença do patógeno radicular *Mycelium radialis atrovirens*. Sementes de *Pinus clausa* revelaram resistência a *Phytophthora cinnamomi*, quando ectomicorrizadas com *P. tinctorius* em condições não axénicas, exibindo 70% de sobrevivência ao fim de dois meses, contra 40% das sementes não micorrizadas. Nestes germinantes 76-90% das raízes laterais, revelaram-se resistentes por estarem micorrizadas, sendo susceptíveis as restantes raízes, não tendo sido detectados os efeitos da infecção nessas raízes (Marx, 1972). Germinantes de *Betula*, micorrizados com *Hebeloma crustuliforme*, apresentaram resistência a *Pithium* sp. quando inoculados em solos infestados por este fungo ( Perrin & Garbaye, 1983).

Os resultados descritos, criaram esperanças de que as ectomicorizas possam constituir um meio privilegiado de luta biológica contra numerosos agentes patogénicos, sobretudo os que actuam a nível radicular (Marx, 1972; Azevedo, 1973; Bergougnoux & Verlhac, 1978; Perrin & Garbaye, 1983; Chèvre, 1985; Nazaré Pereira, 1987 ). O mecanismo pelo qual se dá este tipo de protecção, não é conhecido, sendo apresentadas várias hipóteses para o explicar (Bergougnoux & Verlhac, 1978; Chèvre, 1985; Nazaré Pereira, 1987; Barroso, 1988):

- 1 - Alteração das condições nutricionais da planta, por estímulo do vigor vegetativo e equilíbrio fisiológico.
- 2 - Consumo de nutrientes do solo, junto da raiz, impedindo o desenvolvimento do agente patogénico.
- 3 - Criação de condições tendentes a alterar, qualitativa ou quantitativamente, a microflora da rizosfera tornando-a hostil ao agente patogénico.
- 4 - Criação, através do manto, de uma barreira mecânica à penetração dos referidos agentes.
- 5 - Síntese de compostos que possam impedir o crescimento de potenciais agentes patogénicos (nomeadamente compostos fenólicos) (Marx, 1969).
- 6 - Pré-indução de mecanismos de defesa da planta, aquando da infecção pelo fungo micorrízico.

É conhecida a capacidade de síntese de antibióticos por certos fungos micorrízicos, em cultura axénica. Esta capacidade, no entanto, não permite afirmar que os mesmos desempenhem qualquer papel de controlo na infecção das raízes micorrizadas (Zak, 1964; Marx, 1969).

A pré-indução pelo fungo de mecanismos de defesa da planta poderia levar a pensar na produção de moléculas responsáveis por esse mecanismo, como as fitoalexinas. A síntese de alguns destes compostos está dependente da actividade da fenilalanina amónia liase (PAL), responsável pelo início das reacções que levam à síntese de fenilpropanóides nas plantas superiores, e nomeadamente de fitoalexinas e precursores da síntese de lenhinas. A actividade da PAL, é alterada quando a planta é atacada por um agente patogénico, sujeita a uma agressão física,

ou a uma exposição a intensidades luminosas elevadas. Plantas de *Pinus sylvestris* quando micorrizadas com *Laccaria laccata* não apresentaram alterações da actividade da PAL (Ronald & Söderhäll, 1985).

Não é conhecido o mecanismo pelo qual, os fungos micorrízicos se associam às raízes das plantas, sem despoletar a activação da PAL. Deste modo, evitam simultaneamente a síntese suplementar de lenhinas que lhes dificultariam a infecção e expor-se à acção de fitoalexinas (Ronald & Söderhäll, 1985). Estes resultados levam-nos a excluir, numa primeira análise, a hipótese de pré-indução de mecanismos de defesa por parte dos fungos micorrízicos, pois estes não são, aparentemente, despoletados por eles. Terá de pensar-se noutros tipos de mecanismo, pois a planta parece à partida reconhecer sem dificuldades, os fungos micorrízicos dos patogénicos. O reconhecimento dos fungos simbióticos parece estar relacionado com a existência de lectinas (Duddridge, 1986).

### 3.3 · Fungos Micorrízicos

Os fungos micorrízicos apresentam uma grande diversidade taxonómica, podendo formar-se micorrizas com fungos pertencentes às classes dos Basidiomicetos, Ascomicetos e Ficomícetos. Enquanto os fungos parasitas obrigatórios apresentam, de um modo geral, elevada especificidade hóspede/hospedeiro, os fungos micorrízicos não apresentam grande especificidade (Harley, 1986). Os fungos que formam micorrizas pertencem fundamentalmente a três classes dos *Eumycetas*: *Basidiomycotina*, *Ascomycotina* e *Zigomycotina*. O maior número pertence aos *Basidiomycotina*, sendo apenas conhecido um género nos *Zigomycotina*.

A maioria dos fungos ectomicorrízicos possui um grande número de hospedeiros com os quais é capaz de estabelecer associação. Alguns fungos como *Cenococcum graniforme* podem mesmo estabelecer ectomicorrizas com espécies que habitualmente formam endomicorrizas, tendo ainda capacidade de formar endomicorrizas com plantas do género *Stellaria* (Duddridge, 1986). Verifica-se que um mesmo hospedeiro é capaz de estabelecer ectomicorrizas com mais do que uma espécie de fungo, podendo esta associação dar-se simultaneamente. Apesar da reduzida especificidade das associações micorrízicas verifica-se por vezes, alguma especificidade hóspede/hospedeiro a nível do género (Duddridge, 1986).

Foram reconhecidos três grupos de fungos ectomicorrízicos: 1) fungos com uma gama de hospedeiros muito alargada, incluem fungos como *Amanita muscaria*, *Thelephora terrestris*, *Paxillus involutus*, *Pisolithus tinctorius* e *Cenococcum graniforme*; 2) fungos com uma gama de hospedeiros intermediário; e 3) fungos com um número relativamente pequeno de hospedeiros possíveis. Alguns fungos são considerados específicos das coníferas, tal é o caso dos géneros *Rhizopogon*, *Suillus* e *Truncocolumella* ou mesmo específicos de um determinado género como acontece relativamente a *Alpova diplophloeus* específico para *Alnus* e com *Hydnagium carneum* específico para

*Eucalyptus* (Duddridge, 1986).

Tem sido possível isolar em cultura axénica muitos fungos que formam ectomicorrizas. Estes fungos apresentam frequentemente, capacidade de desenvolvimento na rizosfera de plantas que não são potencialmente micorrízicas. Isto mostra que estes fungos não são micorrízicos obrigatórios, no sentido restrito, embora se possam considerar ecologicamente como tal (Harley & Smith, 1983).

Os fungos ectomicorrízicos, no geral, não apresentam capacidade para usar a lenhina e a celulose como fonte de carbono, embora tenham sido encontradas algumas estirpes com essa capacidade (Harley & Smith, 1983). Algumas estirpes de fungos ectomicorrízicos são capazes de produzir em cultura, enzimas extracelulares como as pectinases, celulasas e hemicelulasas e ainda fenoloxidasas, que lhes permitem usar os substratos destas como fonte de carbono preferencial. O facto de algumas estirpes ou mesmo a maioria, não produzir nenhuma delas, ou as produzir em quantidades muito baixas sugere que estas não são indispensáveis no estabelecimento da associação micorrízica. A capacidade de alguns fungos produzirem estas enzimas, foi encarada como uma forma de adaptação ao desenvolvimento micorrízico e saprófito (Harley & Smith, 1983).

A produção de ácido indol acético (IAA) é característica de alguns fungos, como dissemos já, sendo a produção deste relacionada com a capacidade de formação de algumas estruturas micorrízicas nomeadamente a rede de Hartig (Gay et al., 1994). O papel destes compostos no estabelecimento da associação simbiótica está no entanto longe de estar esclarecido, sendo ainda difícil de apoiar integralmente a hipótese de Slankis (Smith & Read, 1997).

Verifica-se que alguns fungos ectomicorrízicos são capazes de sintetizar citocininas. Esta, no entanto, não é uma característica geral. Alguns fungos são capazes de induzir a produção destes compostos, quando em associação com as raízes, apesar de não produzirem citocininas em cultura pura (Wullschlegel & Reid, 1990).

A produção de antibióticos e outros compostos antagonistas do crescimento de microrganismos ocorre também nalgumas espécies de fungos micorrízicos, mas à semelhança do que acontece com outras sínteses, esta não é exclusiva dos fungos ectomicorrízicos e nem todos a apresentam (Harley & Smith, 1983).

### 3.4 · Ectomicorrizas de Castanheiro

O castanheiro, à semelhança da maioria das espécies florestais, apresenta as raízes ectomicorrizadas em condições naturais (Alvarez, 1984). As raízes micorrizadas de castanheiro situam-se na zona superficial do solo (5-20 cm) e estão concentradas essencialmente em redor do tronco das árvores adultas, num círculo de aproximadamente 1-2 m de raio (Valjalo, 1979; Nazaré-Pereira, 1987).

Foram elaboradas listas de fungos micorrízicos de castanhei-

ro com base na ocorrência de carpóforos em soutos e castiçais (Valjalo & Delmas, 1982) que se encontra resumida num quadro resumo apresentado em Nazaré-Pereira (1987) e alterado em Martins (1992). Porém a presença de frutificações de um fungo em povoamentos naturais possui apenas carácter presuntivo da associação micorrízica (Nazaré-Pereira, 1987).

Tanto quanto é do nosso conhecimento, a especificidade e importância relativa das associações micorrízicas de castanheiro, não tem sido provada *in vitro*, senão para um grupo muito reduzido de fungos, entre os quais *Hebeloma cylindrosporum*, *Lyophyllum decastes* (Valjalo, 1979) e *Tuber melanosporum* (Nazaré-Pereira, 1987).

O número de fungos conhecidos capazes de estabelecer associações com raízes de castanheiro é relativamente reduzido. A existência de espécies de fungos específicas do castanheiro é pouco clara, alguns dos fungos micorrízicos de castanheiro (*Boletus edulis*, *B. pinicola*, *Russula cyanoxantha*, *Chantarellus cibarius* e *Hydnum repandum*, entre outros) formam micorrizas com muitas outras espécies de Angiospérmicas e Gimnospérmicas, podendo no entanto ser mais frequentes em povoamentos de folhosas (*Amanita caesaria*, *B. aereus*, *Gyroporus castaneus*, *Russula virescens*, *Tuber aestivum*) (Nazaré-Pereira, 1987). Vários outros trabalhos de inventário de macrofungos em povoamentos de castanheiro em Portugal foram sendo feitos, contribuindo não só para o melhor conhecimento das potenciais espécies micorrízicas de castanheiro, como também para a avaliação do valor de um possível recurso complementar destes povoamentos (Azevedo, 1989; Menezes, 1990; Meireles, 1997).

Tendo em conta o efeito profilático das principais doenças radiculares que as micorrizas podem assegurar (Marx, 1972, 1974; Azevedo, 1973; Bergougnot & Verlhac, 1978; Perrin & Garbaye, 1983; Perrin, 1985; Nazaré Pereira, 1987), e a importância de que se reveste a doença da tinta do castanheiro, podemos depositar algumas esperanças no uso de fungos micorrízicos, como forma de ajudar a ultrapassar este problema.

Os factores potencialmente responsáveis pela protecção conferida pelas micorrizas, têm particular importância no castanheiro, dadas as características que a infecção por *Phytophthora* apresenta (Nazaré-Pereira, 1987):

- a infecção por *Phytophthora cinnamomi*, fungo causador da doença da tinta, assim como o desenvolvimento da associação micorrízica, ocorre nas extremidades da raíz.

- a infecção por *P. cinnamomi* é favorecida por lesões radiculares. O manto fúngico, protege a raíz da acção abrasiva das partículas do solo e outras.

- testes *in vitro* revelaram antagonismo moderado entre *P. cinnamomi* e fungos micorrízicos de castanheiro. *B. bovinóides*, *H. cylindrosporum* e isolamentos de *Clitocybe* spp. demonstraram antagonismo *in vitro*, em vaso e em viveiro em relação a *P. cinnamomi* (Vrot

& Grente, 1985 *in* Nazaré-Pereira, 1987).

- a percentagem de mortalidade de plântulas em solo contaminado com *P. cinnamomi*, foi substancialmente reduzida com a micorrização com *Scleroderma aurantium*, *B. luteus*, *H. cylindrosporum*, *A. caesarea* assim como com isolamentos de *Chantarellus* spp, todos estes de ocorrência frequente em sotos e castiçais (Grente & Vrot, 1984; Vrot & Grente, 1985 *in* Nazaré-Pereira, 1987).

- a má drenagem do solo, diminui a taxa de micorrização das raízes (Valjalo & Delmas, 1982 *in* Nazaré-Pereira, 1987). A doença da tinta desenvolve-se intensamente nessas condições (Nazaré-Pereira, 1987).

A micorrização do castanheiro, surge assim como uma medida biológica de prevenção contra a doença da tinta. Os trabalhos de selecção de clones de castanheiro resistentes à tinta devem, segundo Nazaré-Pereira (1987), ser acompanhados a par e passo por estudos sobre o efeito protector das micorrizas no desenvolvimento da doença e do comportamento dos clones mais promissores quanto à micorrização.

### 3.5 · Micorrização *in vitro*

Segundo Duddridge e colaboradores (1984a), a diferença entre a síntese axénica e não axénica de micorrizas reside fundamentalmente, no grau de infecção das raízes. Esta constatação, assim como as de outros autores, validaram a utilização de técnicas de micorrização *in vitro*, como método de estudo do processo de micorrização, em condições controladas.

A utilização de germinantes em sistemas de micorrização *in vitro*, implicam diferenças genéticas entre as plantas, que podem condicionar variabilidade nos resultados de micorrização. As técnicas de micropropagação de plantas permitem controlar as condições ambientais em que se processa a síntese micorrízica e garantir a uniformidade genética, eliminando um factor importante de variabilidade.

No sentido de estudar o processo de micorrização em plantas clonadas, foram micropropagados germinantes de pinheiro (David *et al.*, 1983), bétula (Grellier *et al.*, 1984), castanheiro (Strullu *et al.*, 1986) e eucalipto (Poissonier, 1986). Os estudos de micorrização foram efectuados com *Paxillus involutus* (Pinheiro, castanheiro e eucalipto) (Batsch) Fr. e *Pisolithus tinctorius* (eucalipto).

A micropropagação, como técnica de clonagem de genótipos elite, permite a obtenção de elevado número de plantas com características pré-seleccionadas pelo que, em espécies lenhosas deve ser feita, tanto quanto possível, utilizando explantes de árvores adultas (Bonga, 1987). A micorrização aparece, nos casos de micropropagação de clones adultos, como uma forma de melhorar as condições nutricionais e de aclimação (aumento da eficiência de absorção de nutrientes essenciais, resistência à secura), ao mesmo tempo que constitui um bom sistema de estudo dos efeitos fisiológicos da micorrização.



## II · Objectivo

---

O presente trabalho pretende avaliar a importância do estabelecimento de micorrizas em plantas micropropagadas de castanheiro, nomeadamente nos aspectos de aclimação, sobrevivência e parâmetros de crescimento. Nesse sentido foram realizados alguns estudos anatómicos tendentes a confirmar o estado de micorrização das plantas micropropagadas, compará-lo com o de plantas germinantes e seleccionar o(s) fungo(s) mais efectivo(s) nas condições de estudo; assim como estudos fisiológicos que permitissem avaliar os efeitos da micorrização nos parâmetros que nos propusemos avaliar.



## III · Material e Métodos

---

### 1 · Material

#### 1.1 · Material Biológico

##### 1.1.1 · Plantas

Para a fase de micropropagação foram utilizadas clones obtidos a partir de gomos axilares, de ramos de copa de árvores adultas (idade superior a 30 anos), colhidos em diversos pontos do País, nomeadamente: Sesimbra, Sintra, Alcobaça (Feijó, 1989) e Bragança.

Para a micorrização, foram seleccionadas as plantas do clone de Sesimbra, SE-87, por apresentarem maior capacidade de alongamento e taxas de enraizamento mais favoráveis.

As sementes utilizadas, pertencem à variedade designada por “Judia” e foram colhidas no Distrito de Bragança.

##### 1.1.2 · Fungos Micorrízicos

No processo de micorrização foram utilizadas quatro espécies de fungos de aptidão micorrízica conhecida: *Amanita muscaria* Hooker isolado de Schönbuch/Tübingen, Alemanha, *Laccaria laccata* (Scop. ex Fr.) Berk and Br., isolado de Molina, E.U.A., *Piloderma croceum* Erikss and Hjortst, isolado de Unestam & Nylund l.l. 1976, Suécia e *Pisolithus tinctorius* (Pers). Coker and Couch, isolado 289/Marx, E.U.A.

Os fungos utilizados foram gentilmente cedidos ao laboratório, pelo Instituto Botânico da Universidade de Tübingen (Institut für

Botanik, Spezielle Botanik, Mykologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen), na pessoa do Professor Oberwinkler e Ingrid Kottke.

## 1.2 · Equipamento

No processo de micropropagação, todas as manipulações em esterilidade foram efectuadas em câmara de fluxo laminar horizontal Bioblock Scientific e CRC.

A esterilização de meios de cultura foi realizada em autoclave AJC, e a de instrumentos de dissecação e acessórios para cultura, em estufa de esterilização Haeraeus.

As culturas axénicas de fungo cresceram numa estufa Memmert RO 8.

O crescimento das plantas processou-se numa câmara de cultura, com fotoperíodo e termoperíodo controlados e equipada com lâmpadas Sylvania Gro-Lux.

Aspectos macroscópicos do material foram fotografados com uma máquina fotográfica Asahi-Pentax K1000, equipada com objectivas de 50 mm e 28 mm.

A observação do material foi realizada numa lupa binocular Wild M8, num microscópio óptico Leitz-Wetzlar Dialux, com condensador de contraste interferencial de Nomarski.

Os cortes semifinos foram efectuados com facas de vidro num ultramicrotomo Porter-Blum Sorvall MT-2B.

As observações de microscopia electrónica de varrimento foram realizadas num microscópio Jeol JSM T-220.

Os parâmetros foliares das plantas foram determinados com os medidores de área foliar LI-COR, LI 3000 e LI-COR, LI-3000 A portátil.

Na extracção de proteínas foi utilizada uma centrífuga refrigerada Sigma 2K 15, B Braun.

As quantificações de proteína e pigmentos foram efectuadas num espectrofotómetro Shimadzu UV 160 A.

Os valores de cintilação, para a determinação da actividade da Ribulose-Bisfosfato-Carboxilase-Oxigenase (RubisCO) foram efectuados num Contador de Cintilação Beckman LS-7800.

A determinação dos valores de consumo e libertação de CO<sub>2</sub>, foi efectuada num Analisador de Gases por Infravermelhos (IRGA) ADC-225-MK3. A iluminação das plantas em estudo, foi feita com uma lâmpada Hansatech Ls-2H com radiação fotossinteticamente activa de 1200  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-2}$ .

A aclimação das plantas foi realizada inicialmente numa câmara de aclimação Cassel, e ulteriormente numa câmara Fitoclima ARALAB.

## 2 · Métodos

### 2.1 · Germinação de Sementes

A germinação de sementes foi feita em assépsia, tendo sido

usado como substrato perlite hidratada com água da torneira.

Em frascos de 1500 ml foram colocados 250 ml de perlite, que se hidratou com cerca de 150 ml de água (o volume necessário à hidratação da perlite é variável). Procedeu-se à esterilização do substrato em autoclave, durante 30 minutos, 120 °C e 1 Bar de pressão.

As sementes foram esterilizadas em hipoclorito de sódio (NaOCl, 2.5% de cloro activo), durante 30 minutos. Após várias lavagens em água destilada estéril, foram seccionadas de modo a deixar o embrião envolvido por uma porção reduzida dos cotilédones e transferidas para os frascos previamente preparados.

A germinação das sementes ocorreu em câmara de cultura com fotoperíodo de 16 h de luz e 8 h de escuridão e termoperíodo correspondente de 25 °C e 18 °C. A intensidade luminosa de 2000 lux foi mantida constante.

## 2.2 · Micropropagação

A micropropagação de clones adultos de *Castanea sativa* Mill. foi realizada segundo o método descrito por Feijó (1989). O método consiste em cinco fases sequenciais: inoculação dos gomos axilares, multiplicação dos meristemas por rebentamento axilar, alongamento dos rebentos, enraizamento e aclimatação.

Cada um dos passos de micropropagação foi realizado em meio de Gresshof & Doy (1972) modificado (3 mg/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 80 mg/l FeNaEDTA), com diferentes concentrações de fitorreguladores incorporadas no meio, ou por imersão prévia (enraizamento).

Subculturas foram realizadas com intervalos de quatro semanas, com alternância de uma fase de multiplicação com uma de alongamento, seguida da indução de enraizamento das plantas alongadas.

As plantas foram mantidas em todas as fases de micropropagação e enraizamento, em câmara de cultura com fotoperíodo de 16 h de luz e 8 h de escuridão e termoperíodo correspondente de 25 °C e 18 °C. A intensidade luminosa de 2000 lux foi mantida constante.

## 2.3 · Cultura dos Fungos Micorrízicos

As culturas axénicas dos fungos micorrízicos, *A. muscaria*, *L. laccata*, *P. croceum* e *P. tinctorius*, foram mantidas em caixa de Petri em meio de Melin & Norkrans (MMN) (Marx, 1969). A repicagem das culturas efectuou-se com intervalos de três semanas, sendo a repicagem realizada por transferência de 4-5 inóculos de 0.5 cm de diâmetro, retirados da região periférica das culturas em crescimento e colocados em posição invertida sobre o meio de cultura. A incubação das culturas de fungo foi feita no escuro, a uma temperatura constante de 23 °C.

Culturas de fungos em tubo de ensaio e caixa de Petri, foram também mantidas a uma temperatura de 4 °C, como forma de armazenamento de micélios com taxas de crescimento retardado, para renovação cíclica das culturas envelhecidas pelos sucessivos ciclos de crescimento.

## 2.4 · Micorrização

Descrever-se-ão duas metodologias correspondentes a duas fases distintas do trabalho, que designaremos por F1 e F2, e que são respectivamente: F1 – metodologia utilizada na fase inicial do trabalho, na qual se procedeu ao teste da eficiência dos fungos, com plantas de semente e micropropagadas; F2 – metodologia utilizada na fase de optimização do processo de micorrização com o fungo seleccionado durante F1, e realizada somente com plantas micropropagadas.

### 2.4.1 · Preparação dos Substratos

O substrato para micorrização consistiu numa mistura de perlite e sphagnum na proporção de 3:1 (V/V). O meio utilizado nos substratos para micorrização foi o meio MMN liquido.

F1 - Frascos de vidro de 1500 ml de capacidade com 250 ml da mistura de substrato, foram esterilizados duas vezes com um intervalo de uma semana, em autoclave a 121°C e 1 Bar de pressão (45 min; 30 min) de modo a garantir a perfeita esterilização dos substratos. Ao substrato estéril foi adicionado meio de cultura liquido (cerca de 150 ml). Procedeu-se de seguida, a uma última esterilização de 20 min em condições idênticas às anteriores.

F2 - Foram usados frascos de vidro de menor capacidade (350 ml). Em cada frasco foram colocados 150 ml de substrato e cerca de 80 ml de meio MMN liquido. As esterilizações foram semelhantes às descritas em F1, tendo sido reduzidos os tempos de esterilização para 30 min, 25 min e 20 min respectivamente.

### 2.4.2 · Inoculação dos Substratos

F1 - A inoculação dos substratos foi feita simultaneamente com a transferência das plantas germinadas ou micropropagadas. Para cada frasco foram transferidas quatro plantas, inoculando-se em posição equidistante de cada uma delas, cinco inóculos sólidos com 0.5 cm<sup>2</sup> cada, de um dos fungos micorrízicos a testar: *A. muscaria*, *L. laccata*, *P. croceum* ou *P. tinctorius* (retirados das culturas axénicas em meio sólido). Foram preparados ainda frascos testemunha, nos quais não se inocularam quaisquer fungos.

F2 - A inoculação dos substratos com o fungo seleccionado durante F1, foi realizada antes da transferência das plantas micropropagadas. Três semanas antes da transferência das plantas, os substratos foram inoculados com cinco inóculos de *P. tinctorius*, em posição equidistante. A incubação foi feita a 25°C, no escuro, até à transferência das plantas.

### 2.4.3 · Transferência das Plantas

F1 - As plantas foram transferidas para o substrato de micor-

rização cinco semanas após a germinação, para as plantas de semente e cinco semanas após a indução do enraizamento, nas plantas micropropagadas.

Em cada frasco foram colocadas quatro plantas e cinco inóculos de um dos fungos em teste (*A. muscaria*, *L. laccata*, *P. croceum* e *P. tinctorius*). Os frascos foram colocados em câmara de cultura com fotoperíodo e termoperíodo semelhantes aos utilizados na germinação e na micropropagação.

F2 - A transferência das plantas micropropagadas para os substratos previamente inoculados com *P. tinctorius*, foi feita cinco semanas após a indução do enraizamento, tendo sido transferidas três plantas para cada frasco. As plantas foram colocadas em câmara de cultura com o fotoperíodo e termoperíodo já referidos.

Em cada um dos casos, foram transferidas plantas para substratos estéreis, ou seja substratos em que não foi inoculado fungo, as quais constituíram os testemunhas dos ensaios de micorrização.

## 2.5 · Aclimação

Após micorrização *in vitro*, as plantas foram transferidas para potes, com substrato não estéril, iniciando-se assim o processo de aclimação às condições *ex-vitro*.

O substrato inicialmente utilizado para a aclimação era constituído por sphagnum e esferovite nas proporções de 1:1, tendo numa segunda fase sido substituída a esferovite por perlite, em idêntica proporção.

Os potes de 200 cm<sup>3</sup> utilizados para a aclimação, levaram substrato saturado de água antes da transferência das plantas. As plantas foram transferidas juntamente com parte do substrato de micorrização e mantidas em câmara de aclimação com fotoperíodo idêntico àquele a que estavam anteriormente submetidas e níveis de humidade relativa, nas duas primeiras semanas, da ordem da saturação. A redução progressiva para níveis de humidade relativa da ordem dos 90%, 80%, 70% até aos níveis de humidade relativa ambiente, efectuou-se também com intervalos de duas semanas.

Numa última fase, a aclimação foi realizada em câmara fitoclima, com saturação de humidade, durante sete dias, seguida de redução progressiva de humidade, de 5% em cada sete dias, até aos níveis de humidade relativa ambiente. O fotoperíodo a que estiveram submetidas foi de 16 h luz e 8 h escuridão, intensidade luminosa de 5000 lux, e temperatura diurna e nocturna de 23°C e 18°C respectivamente, com gradação entre a máxima e mínima ao longo de 1h antes e depois do período de luz.

## 2.6 · Métodos de Estudo das Micorrizas

### 2.6.1 · Observação “*in vivo*”

Ao longo do tempo de micorrização, procedeu-se à observa-

ção das raízes *in vivo*, desde as cinco até às trinta semanas.

Após lavagem em água corrente, as raízes das plantas foram observadas e fotografadas, de modo a permitir avaliar a existência e extensão da micorrização.

As raízes das plantas foram ainda observadas e fotografadas à lupa binocular.

## 2.6.2 · Microscopia

### 2.6.2.1 · Microscopia Óptica

A observação microscópica das raízes foi realizada em secções transversais, feitas à mão, de material fixado em etanol-acético (Etanol 3 : Ácido Acético 1), branqueado com hipoclorito de sódio 0.5% (cloro activo) e corado com safranina.

Foi ainda observado material fixado em glutaraldeído 2,5% - tetróxido de ósmio 1%, desidratado numa série ascendente de acetonas e impregnado em resinas Spurr ou Epon/Araldite (Mollenhauer, 1964). Cortes semifinos de raízes com 1-4 mm de espessura, foram corados com azul de toluidina ou coloração dupla safranina-azul de metileno-azur A (Warmke & Sheu-Ling, 1976) observados e fotografados.

Foram ainda observadas, raízes inteiras fixadas em etanol-acético, após branqueamento com hipoclorito de sódio, lavagem em água e coloração com safranina.

### 2.6.2.2 · Microscopia Electrónica de Varrimento

Para observação em microscopia electrónica de varrimento, as raízes foram fixadas em glutaraldeído 2.5% (em tampão cacodilato de sódio 0.05M, pH 7.0), desidratadas numa série ascendente de acetonas como em 2.6.2.1. e secas segundo o método de ponto crítico. Após montagem em porta amostras do microscópio electrónico de varrimento, o material foi coberto com uma fina camada de ouro e observado a 10 KV.

## 2.7 · Estudo dos Parâmetros de Crescimento

O crescimento das plantas foi acompanhado desde a passagem a condições *ex-vitro*, até aos oito meses de adaptação a essas condições.

### 2.7.1 · Crescimento

A quantificação do crescimento por alongamento, foi realizada por medição da altura das plantas aclimatadas e pela contagem do número de folhas ao longo do tempo, com intervalos variáveis.

### 2.7.2 · Parâmetros Foliare

Nas plantas em curso de micorrização foram determinados os seguintes parâmetros: número total de folhas, área foliar total das

plantas, área foliar por folha, peso fresco das folhas e peso por unidade de área das mesmas.

A partir das quinze semanas de aclimação, foi quantificada com o medidor de área foliar portátil (não destrutivo), a área foliar total das plantas ao longo do tempo, dado que as plantas apresentavam já folhas mensuráveis com este equipamento

## 2.8 · Estudo dos Parâmetros Fisiológicos

### 2.8.1 · Determinação da Relação Peso Seco/Peso Fresco

A relação entre o peso seco e o peso fresco das plantas micorrizadas e não micorrizadas foi determinado, em folhas, caules e raízes, para plantas com 6 e 10 semanas de micorrização e em folhas de plantas com 20 semanas de micorrização.

O material fresco foi pesado e posto a secar envolvido em papel de alumínio, em estufa a 60°C. Após 48h de secagem, fechou-se herméticamente o papel de alumínio sobre o material seco (dentro da estufa), e efectuou-se a sua pesagem. Retirado o material, procedeu-se à pesagem do papel de alumínio, para determinação da tara. Determinou-se a relação entre o peso seco e o peso fresco.

### 2.8.2 · Determinação do Teor em Proteína Solúvel

A quantificação da proteína foi efectuada espectrofotométricamente pelo método de Comassie Fast Blue (Bradford, 1976).

A recta de calibração do aparelho foi construída, antes da quantificação da proteína, com seis soluções de albumina bovina (BSA), preparadas de fresco. O método utilizado para a construção da recta de calibração foi o que se utilizou para a quantificação:

- Numa cuvete, foi colocado 1 ml de solução de Azul de Comassie, e 20 µl de solução de albumina bovina de concentração conhecida, a recta de calibração foi construída directamente pelo aparelho, por correlação entre a absorvância registada a 595 nm e a concentração correspondente, efectuando-se três medições para cada uma das concentrações em estudo.
- A proteína foi extraída a partir de folhas verdes e precipitada e concentrada segundo Holloway & Armdel (1988).

### 2.8.3 · Determinação do Teor em Pigmentos Fotossintéticos

A quantificação de pigmentos foi realizada espectrofotometricamente, após extração com metanol.

Foram previamente determinadas a área foliar e a massa do material. As folhas foram finamente cortadas e colocadas em 10 ml de metanol. A extração realizou-se no escuro, a 4 °C durante 24h (Ozerol & Titus, 1965). Procedeu-se à medição das absorvâncias a 651nm, 664 nm e 470 nm.

A determinação dos valores das clorofilas **a** ( $Cl_a$ ), **b** ( $Cl_b$ ), total ( $Cl_t$ ) e carotenóides ( $C_{x+a}$ ) foi realizada por aplicação das fórmulas:

$$Cl_a = 16.5 \text{ Abs } 664 - 8.3 \text{ Abs } 651 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

$$Cl_b = 33.8 \text{ Abs } 651 - 12.5 \text{ Abs } 664 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

$$Cl_t = 25.5 \text{ Abs } 651 + 4.0 \text{ Abs } 664 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

$$C_{x+a} = (1000 \times \text{Abs } 470 - 1.62 Cl_a - 104.69 Cl_b) / 221 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

em que

Abs 651 = Absorvância a 651 nm

Abs 664 = Absorvância a 664 nm

Abs 470 = Absorvância a 470 nm

#### 2.8.4 · Determinação da Actividade da RuBisCO

A actividade da ribulose-bisfosfato-carboxilase-oxigenase (RuBisCO), foi determinada por quantificação de cintilação, resultante da incorporação de carbonato radioactivo pelo método de Machler e Nosberger (1980).

O extracto enzimático foi activado na presença de  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  durante 2 minutos. A reacção teve início pela adição do substrato (ribulose bisfosfato) e foi parada 1,5 minutos depois, pela adição de 0,1 ml de HCl 2M.

#### 2.8.5 · Determinação de Parâmetros Fotossintéticos e Respiratórios

As taxas fotossintéticas e respiratórias foram determinadas em plantas em micorrização e respectivas testemunhas ao fim de 4, 5, 6, 8 e 10 semanas.

A quantificação foi feita num analisador de gases por infravermelhos (IRGA), em circuito fechado, com iluminação fria saturante até se atingir o ponto de compensação de  $\text{CO}_2$ , no caso da determinação das taxas fotossintéticas e no escuro para determinação das taxas respiratórias.

As plantas foram mantidas dentro dos frascos de cultura aos quais se adaptou uma rolha perfurada, por onde se fez a ligação dos tubos ao IRGA, em circuito fechado, de modo a manter as plantas nas condições em que se encontravam em ensaio.

Depois da calibração do aparelho, procedeu-se às determinações nas plantas em ensaio, fazendo incidir sobre estas luz fria com intensidade saturante, para determinação das taxas fotossintéticas.

Atingido o ponto de compensação do  $\text{CO}_2$ , o frasco foi colocado em condições de obscuridade, procedendo-se então ao registo das curvas de libertação de  $\text{CO}_2$ , com o objectivo de determinar as taxas respiratórias para as mesmas plantas.

A determinação do consumo e libertação de  $\text{CO}_2$  foi efectuada

em função das áreas foliares das plantas e peso fresco das folhas.

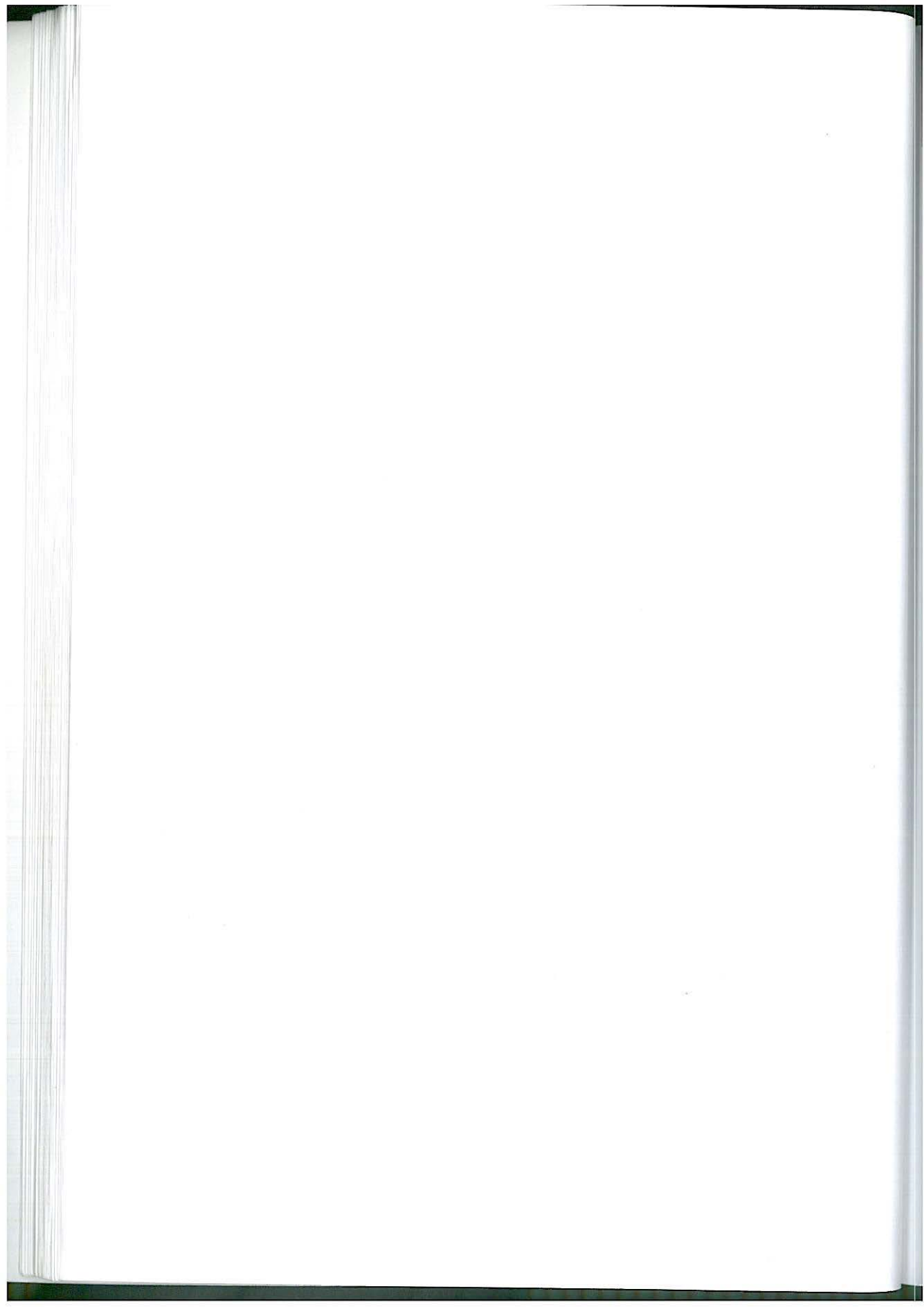
Algumas plantas foram mantidas em ensaio com o objectivo de seguir as taxas fotossintéticas e respiratórias ao longo do tempo, entre as quatro e as dez semanas.

## 2.9 · Análise dos Resultados

Para os resultados de micorrização, sobrevivência e aclimação, foram calculados os valores de  $\chi^2$ .

Os resultados de crescimento em altura e número de folhas, e ainda os teores em proteínas, pigmentos fotossintéticos, taxas fotossintéticas e respiratórias e ponto de compensação do  $\text{CO}_2$ , foram tratados por análise de variância convencional.

A significância dos valores de F calculados, foi estabelecida para probabilidades inferiores a 5% (\*), 1% (\*\*\*) e 0.1% (\*\*\*), considerando-se respectivamente, como significativos, muito significativos e altamente significativos.



## IV · Resultados

---

### 1 · Micorrização

#### 1.1 · Fase 1

##### Extensão da Associação

Ao fim de cinco semanas, não se observou qualquer indício de micorrização nas plantas, ocorrendo no entanto, o aparecimento esporádico de hifas nas proximidades das raízes, quando se procedia a observação microscópica.

Em observações subsequentes, as raízes das plantas apresentavam-se semelhantes ao longo do tempo, até cerca das 15 semanas de ensaio, altura em que se observou associação micorrízica.

De todos os fungos testados, sómente *P. tinctorius* revelou capacidade de se associar com as raízes de *C. sativa* numa extensão significativa (>50% das raízes laterais das plantas infectadas), exibindo ramificação piramidal das raízes laterais, ausência total de pêlos radiculares e um manto envolvente das raízes visível a olho nu.

*P. croceum* não apresentou qualquer capacidade de associação, apesar das raízes exibirem ramificações laterais, muito curtas e arredondadas, típicas de raízes micorrizadas.

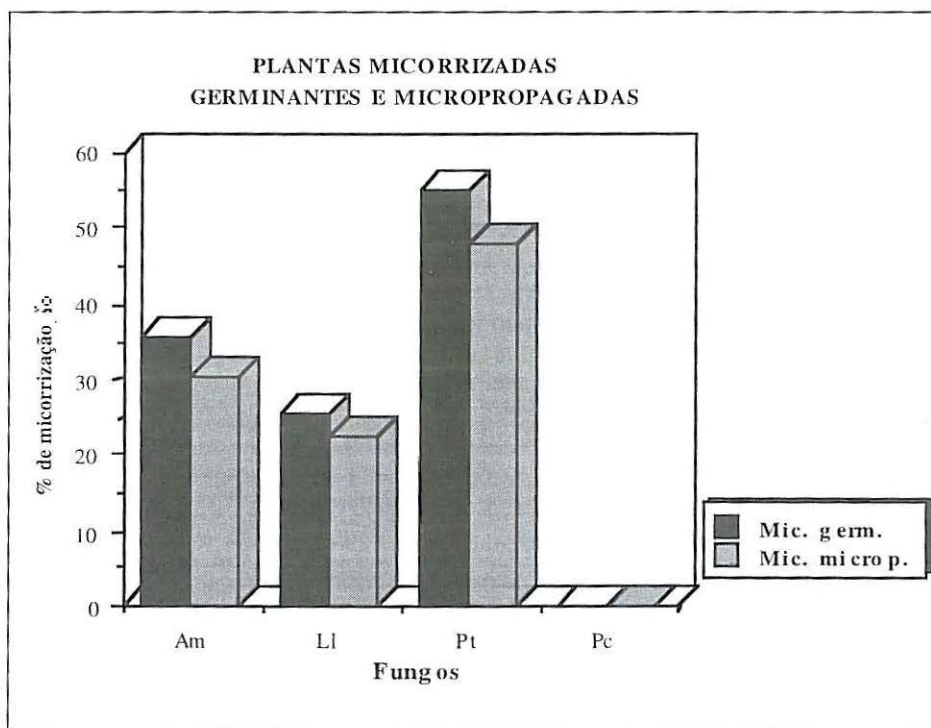
*A. muscaria* e *L. laccata* revelaram capacidade de associação, mas sómente numa pequena extensão das raízes laterais das plantas

(<10% e 20% respectivamente), apresentando-se as raízes, também neste caso, com ramificações curtas e arredondadas e ausência de pêlos radiculares em extensão significativa (>50% das raízes laterais).

Relativamente ao número de plantas micorrizadas, também se verificaram diferenças entre os vários fungos testados, sendo *P. tinctorius* o fungo que se revelou mais eficaz na capacidade de se associar às raízes das plantas.

Na figura I registam-se os resultados de micorrização, expressos em percentagem de plantas micorrizadas sobreviventes, antes da passagem às condições *ex-vitro*. Não foram contabilizadas as plantas mortas, ainda que micorrizadas. Os valores calculados de  $\chi^2$  mostram que os resultados de micorrização encontrados com os quatro fungos, são significativamente diferentes, quer para germinantes ( $\chi^2=14.54$   $P<0.001$ ), quer para plantas micropropagadas ( $\chi^2=10.99$   $P<0.01$ ).

Os resultados apresentados, revelam ainda que não existem diferenças significativas no tipo e extensão da micorrização, entre as plantas de semente e as plantas micropropagadas.



**Figura I** - Percentagem de micorrização em plantas micorrizadas com *A. muscaria* (Am), *L. laccata* (Ll), *P. tinctorius* (Pt), *P. croceum* (Pc) e em plantas testemunha (Cont.).

### Tipo de Associação

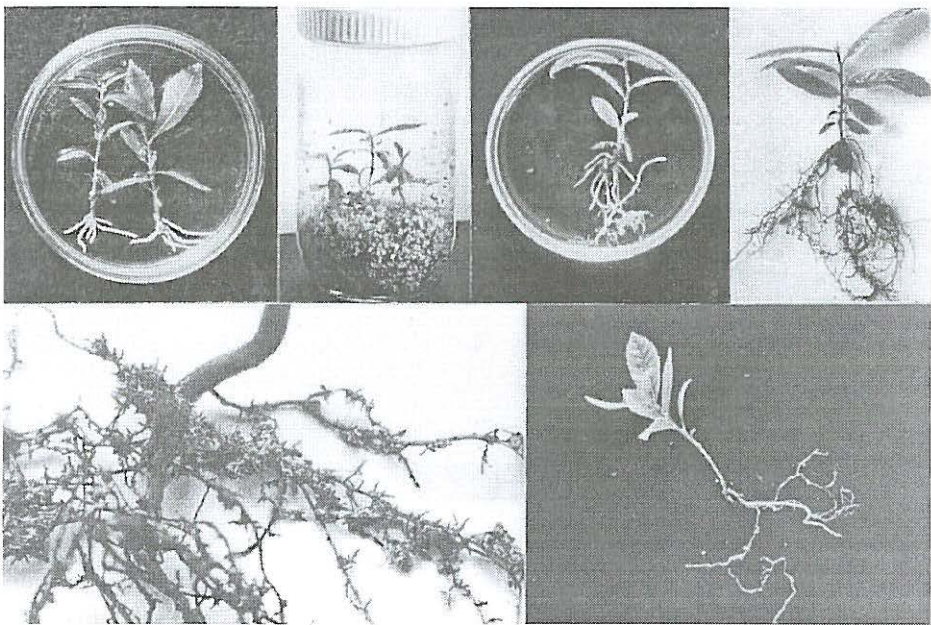
*A. muscaria* - *A. muscaria* exibe manto denso em regiões próximas do ápice das raízes laterais e somente nos casos de associação máxima (Estampa II, d), não sendo visível qualquer manto nas restantes.

Cortes transversais destas raízes, apresentam um manto de espessura muito variável, que pode atingir, no máximo, 20% da espessura total, mas em frequências muito baixas (<5% das raízes laterais infectadas). Nestes casos, verifica-se também a presença de rede de Hartig e o alongamento transversal das células epidérmicas.

A maioria das raízes infectadas porém, apresenta um manto pouco espesso (<10% da espessura total da raiz), e não possui rede de Hartig, nem apresenta alongamento longitudinal das células epidérmicas.

Aspectos de microscopia electrónica de varrimento, mostram que estas raízes se apresentam, na sua maioria, com uma fraca aderência de hifas à sua superfície (Estampa III, a), não exibindo um manto com estrutura definida.

*L. laccata* - *L. laccata* por seu turno, em observações à lupa,

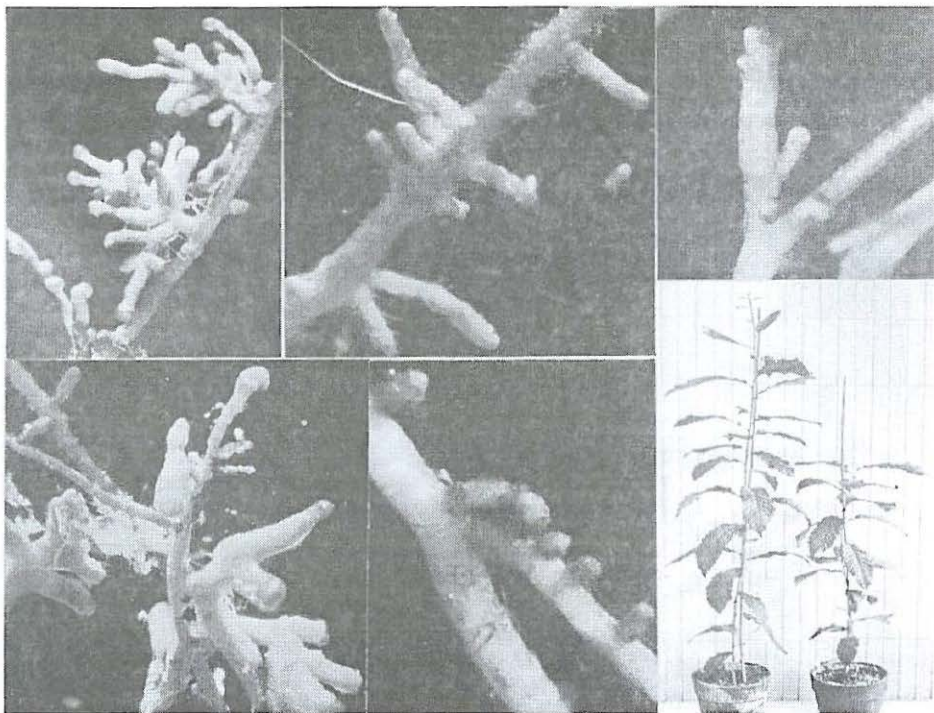


**Estampa I** – *a* - Plantas micropropagadas enraizadas, antes da indução da micorrização. *b* - Plantas micropropagadas em processo de micorrização. *c* - Planta micropropagada com 5 semanas de micorrização. *d* - Planta micropropagada com 10 semanas de micorrização. *e* - Raiz de germinante micorrizada ao fim de 30 semanas de micorrização. *f* - Planta micropropagada testemunha ao fim de 10 semanas de passagem a substrato.

não apresenta indícios seguros da existência de manto, mesmo nas raízes cuja morfologia faz suspeitar da presença do fungo (cerca de 20% das raízes laterais) (Estampa II, b).

Cortes transversais, à semelhança do que ocorria com *A. muscaria*, apresentam mantos de espessura muito variável, com estrutura sinenquimatosa, frequentemente não acompanhados de rede de Hartig ou alongamento das células epidérmicas. Aspectos de micorrização aparecem no entanto, em ramificações muito curtas e arredondadas, que em corte, apresentam rede de Hartig bem visível.

Em microscopia electrónica de varrimento podemos observar, nalguns casos, a presença de manto bem desenvolvido, sempre acompanhado de ruptura na região apical (Estampa III, b) pelo que o crescimento da raiz não é seguido pela associação do fungo, sugerindo



**Estampa II** - a - Aspecto de uma raiz de castanheiro micorrizada com *Pisolithus tinctorius* após 30 semanas de micorrização (x32). b - Aspecto de uma raiz de castanheiro micorrizada com *Laccaria laccata* após 30 semanas de micorrização (x40). c - Aspecto de uma raiz de castanheiro em contacto com *Amanita muscaria* durante 30 semanas (x40). d - Aspecto de uma raiz de castanheiro micorrizada com *Amanita muscaria* após 30 semanas de micorrização (x40). e - Aspecto de uma raiz de castanheiro em contacto com *Piloderma croceum* durante 30 semanas (x40). f - Aspecto geral de plantas micorrizadas (esquerda) e testemunha (direita), após 40 semanas de aclimação.

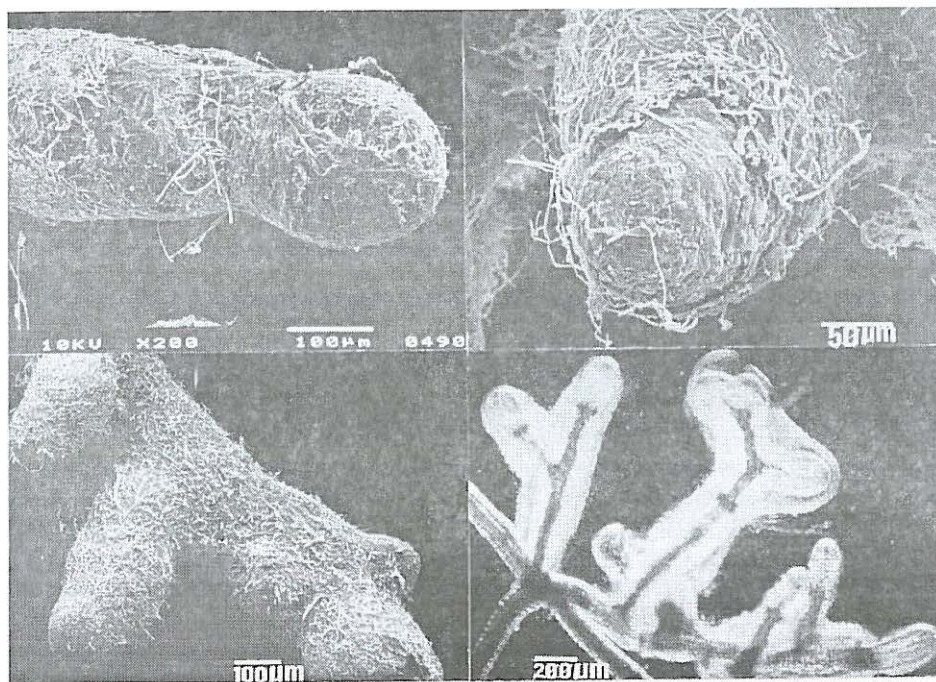
não se tratar de uma micorrização estável.

*P. croceum* - *P. croceum* não apresenta qualquer associação com as raízes de castanheiro. As observações à lupa, apenas evidenciam raízes com ramificações curtas e arredondadas, sem pelos absorventes. As raízes longas porém, exibem pêlos radiculares.

Cortes transversais mostram não existir manto nem rede de Hartig, apresentando a anatomia típica de uma raiz não micorrizada.

Aspectos de microscopia electrónica de varrimento, revelam a inexistência de manto nas ramificações das raízes, podendo ocorrer, esporadicamente, hifas aderentes à superfície.

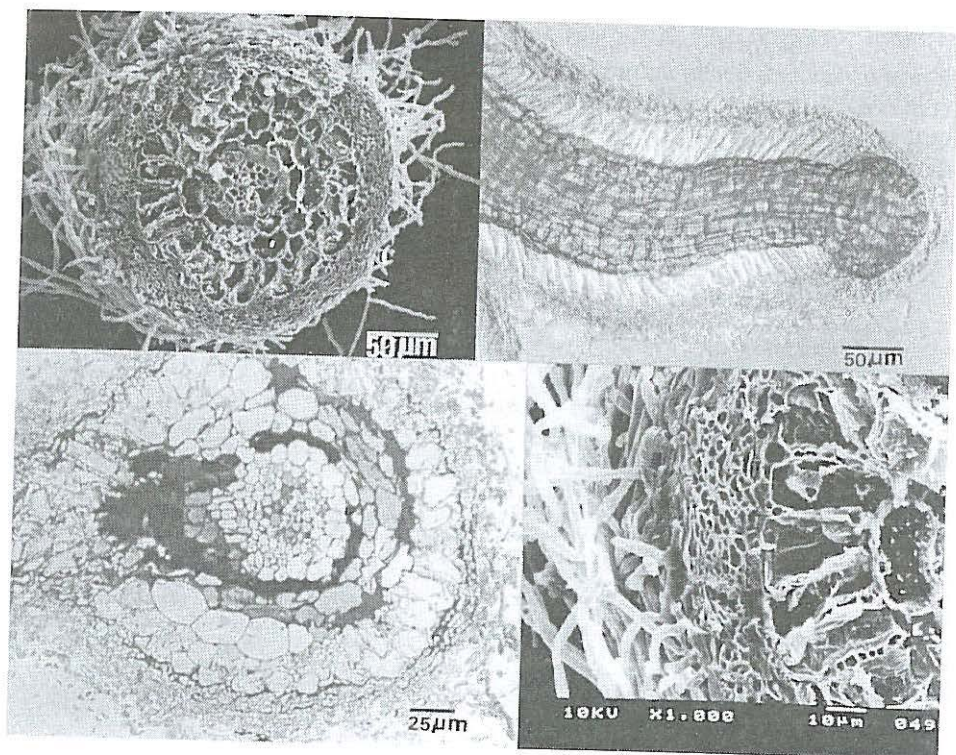
*P. tinctorius* - As raízes observadas à lupa exibem, no caso de *P. tinctorius*, um denso manto de hifas castanho-douradas, que envolvem completamente a raiz (Estampa II, a), constituindo nalguns casos uma rede que envolve simultaneamente várias raízes laterais, conferindo-lhes uma morfologia piramidal.



**Estampa III** - *a* - Raiz de castanheiro micorrizada com *Amanita muscaria* em microscopia electrónica de varrimento (x200). *b* - Raiz de castanheiro micorrizada com *Laccaria laccata*, em microscopia electrónica de varrimento (x350). De notar que o apex radicular rompeu o manto. *c* - Raiz de castanheiro micorrizada com *Pisolithus tinctorius* em microscopia electrónica de varrimento após 5 semanas de micorrização (x100). *d* - Raiz de castanheiro em microscopia óptica (observe-se o manto que envolve a raiz) (x40).

Cortes transversais destas raízes permitem observar a espessura do manto de estrutura sinenquimatosa (Ingleby *et al.*, 1990) e a presença de uma extensa rede de hifas, que penetram entre as células corticais da raiz, constituindo a rede de Hartig. As células epidérmicas envolvidas pela rede de Hartig, apresentam alongamento transversal oblíquo (Harley & Smith, 1983), o que confere às raízes infectadas um aumento de espessura, visível também em secção longitudinal (Estampa IV, a, b, c, d).

Estes aspectos são confirmados em microscopia electrónica



**Estampa IV** - a - Corte transversal de raiz de castanheiro micorrizada com *Pisolithus tinctorius* em microscopia electrónica de varrimento após 30 semanas de micorrização (x350). b - Corte longitudinal de raiz de castanheiro em microscopia óptica micorrizada com *Pisolithus tinctorius* após 30 dias de micorrização. É visível o alongamento das células epidérmicas e a rede de Hartig (x200). c - Corte transversal de raiz de castanheiro micorrizada com *Pisolithus tinctorius* em microscopia óptica após 5 semanas de micorrização. É visível o alongamento das células epidérmicas e a rede de Hartig (x500). d - Corte transversal de raiz de castanheiro micorrizada com *Pisolithus tinctorius* em microscopia electrónica de varrimento após 30 semanas de micorrização. É visível o alongamento das células epidérmicas e a rede de Hartig (x1000).

de varrimento, na qual se observa um espesso manto de hifas que envolvem completamente a raiz, impeditivo da visualização das células epidérmicas e que em corte atinge (para micorrizas com trinta semanas) 25% da espessura da raiz. Nestas micorrizas, observa-se grande quantidade de hifas extrarradiculares ligadas ao manto. Em corte transversal verifica-se que a rede de Hartig se estende à primeira camada de células corticais (Estampas IV, a, c, d).

**Plantas testemunha** - As raízes dos germinantes testemunha apresentam ramificações alongadas, com terminações cónicas e grande densidade de pêlos absorventes em toda a sua extensão. As plantas micropropagadas quase não apresentam ramificações, possuindo um desenvolvimento radicular semelhante ao que adquiriram *in vitro*, frequentemente sem subsequente ramificação (Estampa I, f).

Em corte transversal, apresentam uma estrutura primária, característica desta fase de desenvolvimento radicular e semelhante à apresentada pelas das plantas que cresceram em contacto com *P. croceum*.

Em relação às plantas micropropagadas, a micorrização nunca ocorre nas raízes presentes antes da micorrização, mas sempre nas ramificações que estas formam, já depois de se encontrarem em contacto com o fungo (Estampa I, c, d, f). As plantas testemunha revelam alguma dificuldade na aquisição deste tipo de ramificações.

## 1.2 · Fase 2

A utilização da metodologia 2 correspondeu a uma diminuição significativa do tempo de micorrização, pois observou-se associação em 25-30% das raízes laterais, ao fim de cinco semanas de transferência das plantas.

Os resultados dos ensaios de micorrização bem como as taxas de sobrevivência, durante os ensaios, são apresentados na figura 3. Com esta metodologia verifica-se um aumento das percentagens de micorrização de 45% para 83% em média, e diminuição na percentagem de plantas mortas. Esta diminuiu também para as plantas testemunha.

Importa referir que por plantas micorrizadas, se entendem todas aquelas em que ocorre micorrização em mais de 50% das raízes laterais (avaliação por aproximação, e não por contagem exaustiva) e que, no momento da passagem para condições *ex-vitro* apresentavam viabilidade.

As plantas não micorrizadas não foram contabilizadas nos ensaios ulteriores de aclimação, isso não significa porém, que tenham sido inviáveis. Verificou-se aliás, que estas plantas apresentavam um comportamento intermédio entre as plantas micorrizadas e as plantas testemunha, quer no que se refere à capacidade de aclimação, quer às taxas de crescimento.

A observação das plantas à saída do ensaio de micorrização e passagem a aclimação, permitiu ainda verificar a existência de uma gradação no estado de micorrização, nas plantas provenientes de um

mesmo frasco. Em frascos com três plantas observou-se em todos os casos, que uma delas apresentava micorrização máxima, (frequentemente da ordem dos 100%), enquanto as duas restantes apresentavam micorrização menos extensa e ainda diferente entre si. Na planta menos micorrizada observava-se desenvolvimento radicular pouco superior ao das plantas testemunha, apesar de se observar micorrização. Esta gradação no estado de micorrização, correspondia ainda a uma gradação no mesmo sentido, no desenvolvimento do sistema radicular e da porção aérea da planta.

As raízes das plantas micorrizadas e testemunha apresentam diferenças consideráveis na morfologia e na extensão da ramificação (Estampa I, d, f). Enquanto as plantas micorrizadas exibem exuberância de ramificação após a micorrização, os testemunhas não apresentam ramificação lateral das raízes após passagem para substrato ou esta é muito pouco extensa (Estampa I, d, f).

As micorrizas obtidas nesta fase, apresentaram aspectos semelhantes aos observados na fase I. O manto bem desenvolvido, com estrutura sinenquimatosa, a rede de Hartig e o alongamento das células epidérmicas aparecem, ao fim de cinco semanas, de forma bem distinta, apesar de apresentarem menor desenvolvimento do que o observado para as micorrizas da fase I.

Aspectos de microscopia electrónica de varrimento, mostram que estas raízes apresentam um manto menos desenvolvido, apesar da densidade elevada de hifas que possui. Este apresenta-se mais liso e sem ligação aparente a hifas extrarradiculares, como a observada em micorrizas com trinta semanas.

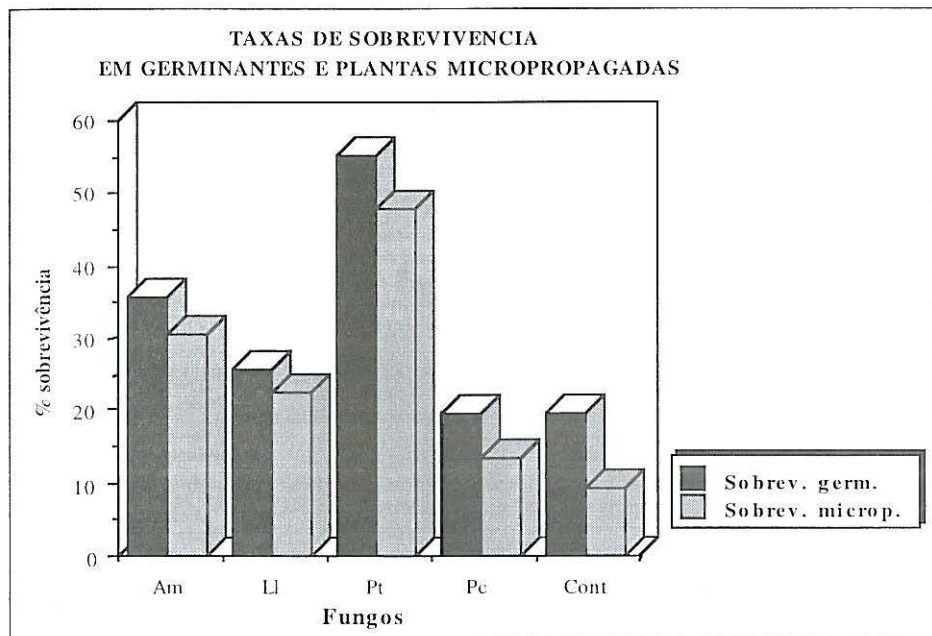
## 2 · Aclimação

### 2.1 · Fase I

A aclimação de plantas micorrizadas revelou-se mais fácil que a das respectivas testemunhas. Consideramos aqui os resultados obtidos para a sobrevivência de plantas micorrizadas e não micorrizadas após a passagem a condições *ex-vitro*.

Os resultados de sobrevivência na fase I (figura 2) do processo revelam que as plantas micorrizadas com *A. muscaria*, *L. laccata* e *P. tinctorius*, tiveram maior capacidade de sobrevivência que as plantas testemunha, ou do que as que estiveram em contacto com *P. croceum*, com diferenças estatisticamente significativas ( $\chi^2=16.9$  para germinantes,  $\chi^2=15.69$  para plantas micropropagadas,  $P<0.01$ ).

Os valores obtidos indicam ainda, que dos três fungos que apresentam melhores resultados de sobrevivência, *P. tinctorius* é o que se revela mais eficaz (54.8 / 47.5%, germinantes / micropropagadas), sendo significativa a diferença entre os resultados obtidos com este fungo e os obtidos com *L. laccata*, *P. croceum* e testemunhas ( $P<0.05$ ), e não significativa a diferença encontrada entre *P. tinctorius* e *A. muscaria* ( $P>0.05$ ), quer em plantas de semente, quer em plantas micropropagadas.

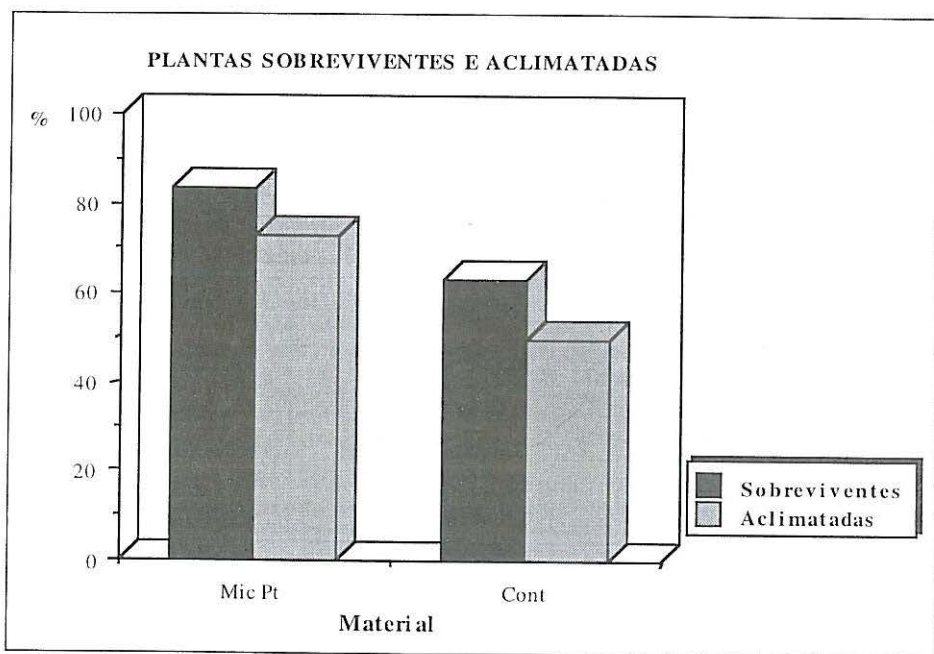


**Figura 2** - Percentagem de sobrevivência em plantas micorrizadas com *A. muscaria* (Am), *L. laccata* (Ll), *P. tinctorius* (Pt), *P. croceum* (Pc) e em plantas testemunha (Cont.).

## 2.2 · Fase 2

Os resultados de sobrevivência obtidos na fase 2 do trabalho (figura 3) confirmam os obtidos na fase 1, verificando-se que a micorrização favorece a sobrevivência das plantas, durante o processo de adaptação às condições *ex-vitro*. Estes resultados indicam ainda que esta metodologia, não só diminui o tempo de micorrização, como aumenta substancialmente a taxa de sobrevivência das plantas (83.0% micorrizadas, 61.2% de plantas testemunha). As diferenças obtidas para as taxas de sobrevivência nesta fase são altamente significativas ( $\chi^2=17.74$   $P<0.001$ ).

Os resultados obtidos para a aclimação destas plantas, depois da passagem às condições *ex-vitro*, são apresentadas na figura 3, onde se apresentam as percentagens de plantas aclimatadas em função do número de plantas sobreviventes do processo de micorrização (sobreviventes) e em função do número inicial de plantas em ensaio de micorrização (aclimatadas). Verificam-se diferenças entre a taxa de aclimação de plantas micorrizadas e testemunha, essas diferenças, porém, não são estatisticamente significativas, se as considerarmos em função dos valores de plantas sobreviventes antes da aclimação ( $\chi^2=0.58$   $P>0.05$ ), mas são muito significativas, se as expressarmos em função do número total de plantas em micorrização no início do processo ( $\chi^2=8.52$   $P<0.01$ ).



**Figura 3-** Percentagem de plantas sobreviventes e aclimatadas micorrizadas e testemunha, respectivamente antes e após o processo de aclimação.

### 3 · Parâmetros de Crescimento

#### 3.1 · Crescimento em Altura

##### Fase 1

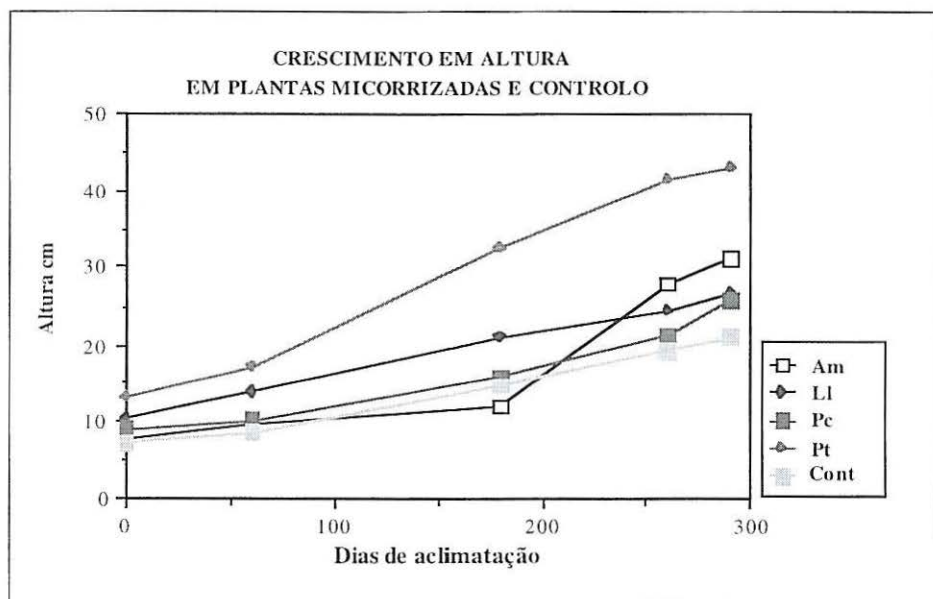
O crescimento das plantas obtidas na primeira fase do trabalho foi acompanhado, por registo do seu crescimento em altura desde o dia de passagem ao solo, até aos 290 dias de aclimação.

Na figura 4 estão representadas as curvas de crescimento médio das plantas micorrizadas com cada um dos fungos e respectivas testemunhas.

Os valores obtidos mostram diferenças significativas entre as alturas das plantas que cresceram em contacto com cada um dos fungos e as plantas testemunha, para todos os tempos de medição ( $P < 0.05$ ). Esta diferença resultou do crescimento diferencial quando do processo de micorrização, sendo já significativa ao fim de trinta semanas, ou seja quando as plantas passaram para condições *ex-vitro*, o tempo zero do nosso registo de alturas .

Os contrastes estatísticos para o crescimento aos 0, 180 e 290 dias de aclimação são ainda apresentados, no sentido de avaliar entre que grupos de plantas micorrizadas existem diferenças significativas de altura, para cada um dos tempos considerados (tabela 1).

Os resultados obtidos mostram que as diferenças entre as



**Figura 4-** Curvas de crescimento médio das plantas micorrizadas com *A. muscaria* (Am), *L. laccata* (Ll), *P. tinctorius* (Pt), *P. croceum* (Pc) e plantas testemunhas (Cont) desde o dia de passagem às condições ex-vitro até aos 290 dias de aclimação.

**Tabela 1 -** Contrastes estatísticos para os resultados de crescimento obtidos com os quatro fungos testados aos 0, 180 e 290 dias de aclimação: NS- não significativo, \* - significativo (<5%), \*\* - muito significativo (<1%) e \*\*\* - altamente significativo (<0.1%).

Dias acl.	A.m.	L.l.	P.c.	P.t.	Cont
<i>A.m.</i> 0	-	NS	NS	*	NS
180	-	NS	NS	*	NS
290	-	NS	NS	NS	*
<i>L.l.</i> 0	-	-	NS	NS	**
180	-	-	*	*	*
290	-	-	NS	**	*
<i>P.c.</i> 0	-	-	-	NS	*
180	-	-	-	NS	NS
290	-	-	-	*	NS
<i>P.t.</i> 0	-	-	-	-	**
180	-	-	-	-	**
290	-	-	-	-	***
Cont 0	-	-	-	-	-
180	-	-	-	-	-
290	-	-	-	-	-

plantas micorrizadas com *P. tinctorius* e as restantes são significativas para 290 dias de aclimação (à excepção de *A. muscaria*). Não existem diferenças significativas, para o mesmo tempo de aclimação, entre plantas micorrizadas e/ou em contacto com os fungos *A. muscaria* - *L. laccata*, *A. muscaria* - *P. croceum* e *L. laccata* - *P. croceum*.

As diferenças em relação às plantas testemunha, são significativas em todos os casos à excepção de *P. croceum*, sendo as significâncias crescentes ao longo do tempo de aclimação, como acontecia com as plantas micorrizadas com *P. tinctorius* em relação às outras plantas.

## Fase 2

As plantas obtidas na segunda fase do trabalho, apresentam taxas de crescimento em altura superiores às testemunhas (estampa II, f), sendo as diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0.05$ ) a partir dos 176 dias de aclimação (figura 5).

### 3.2 · Parâmetros Foliare

O crescimento das plantas na fase 2, foi acompanhado em termos do número de folhas e da área foliar total e por folha das plantas, ao longo do processo de aclimação. Como podemos ver pela figura 6, o número de folhas é superior em plantas micorrizadas, com diferenças estatisticamente significativas aos 260 dias de aclimação ( $P < 0.05$ ).

Os parâmetros foliares das plantas micorrizadas e testemunha, quantificados em termos de área foliar e área foliar média por folha, revelam que as plantas micorrizadas apresentam áreas foliares superiores às plantas testemunha (figura 7). As diferenças encontradas são estatisticamente significativas para os três tempos de medição, quer para os valores de área foliar total, quer para a área foliar por folha ( $P < 0.05$ ).

## 4 · Parâmetros Fisiológicos

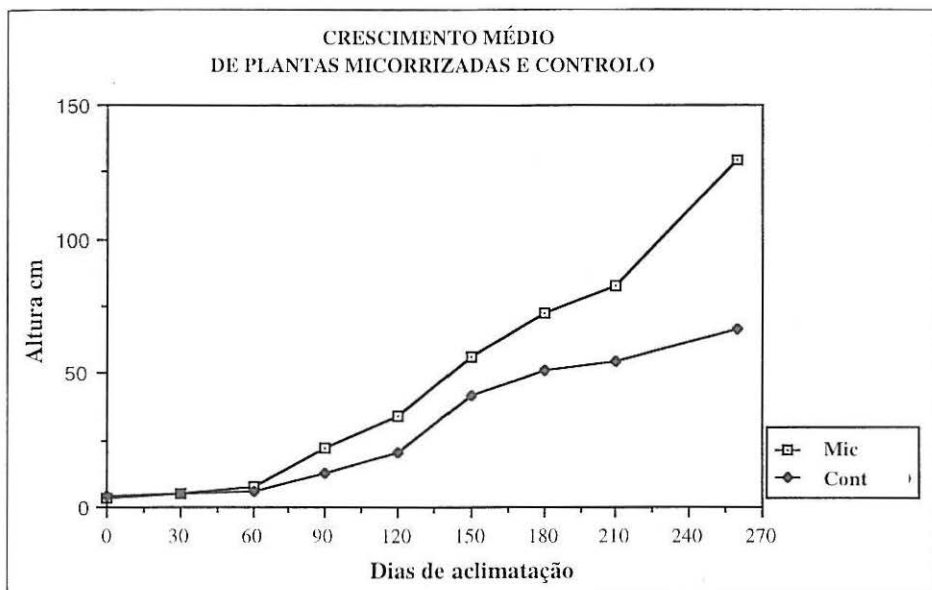
### 4.1 · Relação Peso Seco/ Peso Fresco

Não se observaram diferenças significativas na relação peso seco/peso fresco, em folhas, caules e raízes de plantas micorrizadas e não micorrizadas ao fim de seis e dez semanas de micorrização.

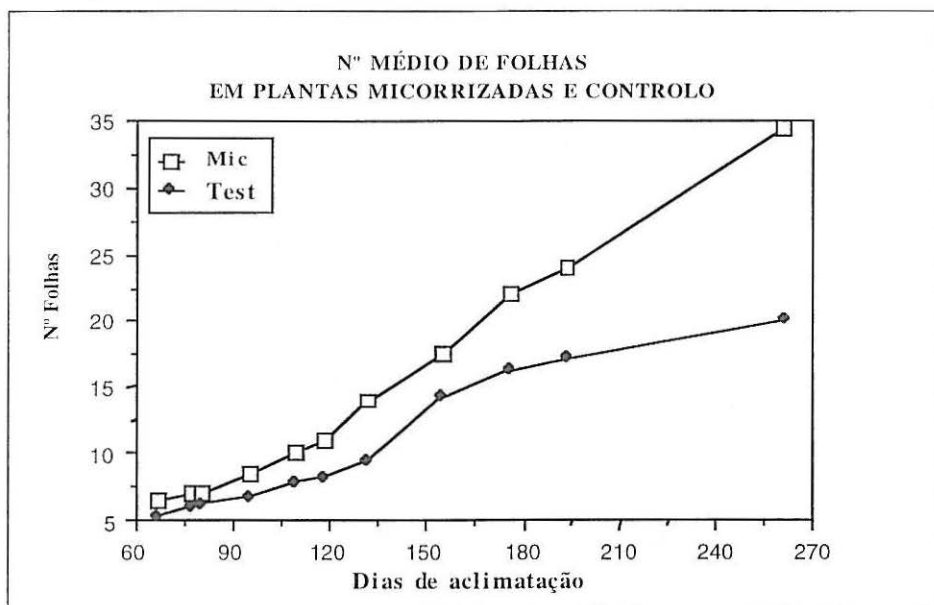
Na figura 8 apresentam-se os resultados obtidos para plantas micorrizadas e respectivas testemunhas às 10 semanas de micorrização. As diferenças da relação peso seco/ peso fresco, não são estatisticamente significativas ( $P > 0.05$ ).

### 4.2 · Proteína Solúvel

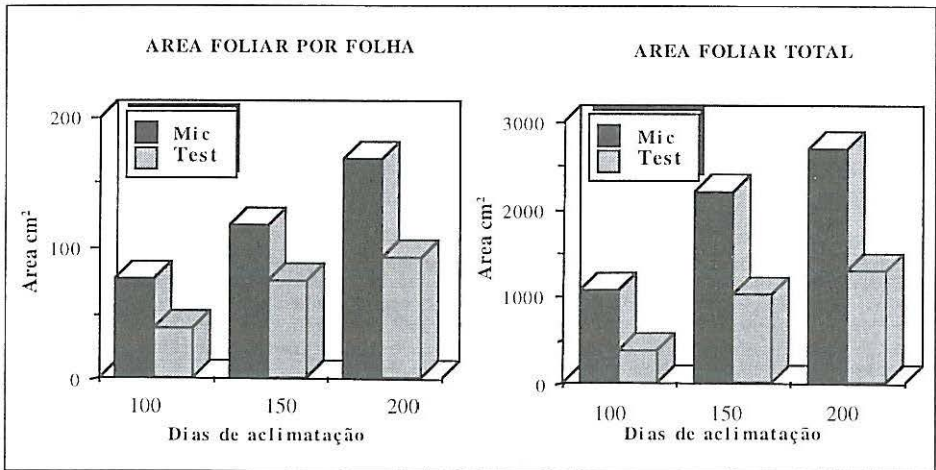
Os valores de proteína solúvel obtidos para plantas micorrizadas e não micorrizadas, mostram a existência de quantidades de proteína muito superiores nas plantas micorrizadas que nas respectivas testemu-



**Figura 5** - Crescimento médio das plantas micorrizadas com *P. tinctorius* (Mic) e respectivas plantas testemunha (Cont) desde a passagem a condições ex-vitro, até aos 261 dias de aclimação às condições ex-vitro.

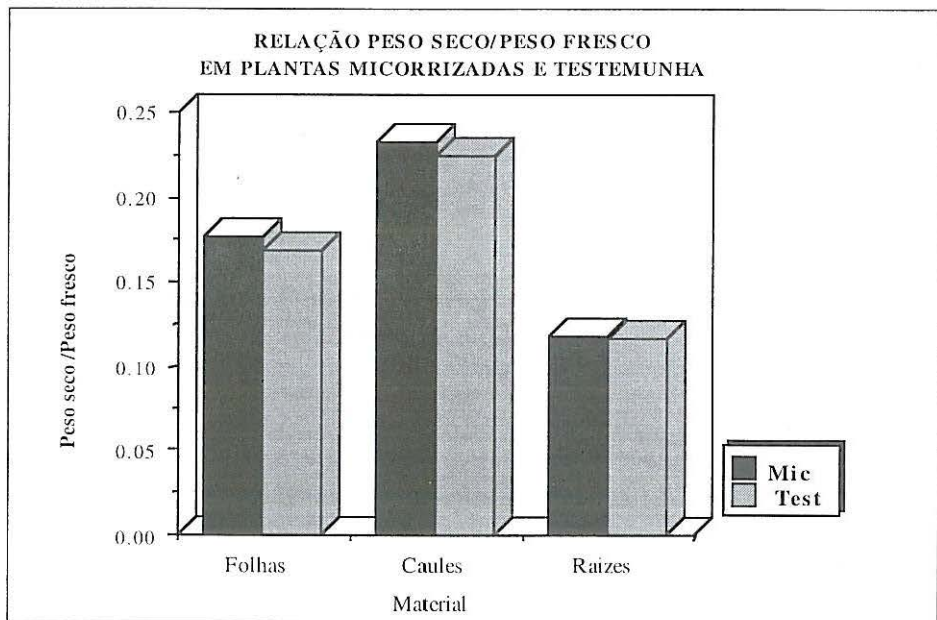


**Figura 6** - Número médio de folhas de plantas micorrizadas com *P. tinctorius* (Mic) e respectivas testemunhas (Test), dos 70 aos 260 dias de aclimação às condições ex-vitro.



**Figura 7** - Áreas foliares médias por folha e totais em plantas micorrizadas com *P. tinctorius* (Mic) e respectivas plantas testemunha (Test).

nhas (tabela 2). As diferenças encontradas são estatisticamente significativas quando a proteína é expressa em peso fresco ( $P < 0.05$ ) e muito significativas quando expressa em peso seco ( $P < 0.01$ ).



**Figura 8** - Relações Ps/ Pf em folhas, caules e raízes de plantas micorrizadas (Mic) e testemunha (Test) após 10 semanas de micorrização.

**Tabela 2** - Teor em proteína solúvel de plantas micorripagadas com *P. tinctorius* e testemunha, expresso em peso fresco (Pf) e em peso seco (Ps). Valores seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes a  $P < 0.05$ .

Proteína (mg/g)										
	8 semanas		10 semanas		12 semanas		14 semanas		25 semanas	
	/Pf	/Ps	/Pf	/Ps	/Pf	/Ps	/Pf	/Ps	/Pf	/Ps
Mic	16.8 a	98.8 a	17.9 a	99.4 a	14.7 a	88.9 a	13.4 a	83.3 a	15.6 a	93.6 a
Test	14.4 b	84.7 b	11.5 b	71.9 b	12.2 b	71.5 b	11.6 b	72.5 b	10.0 b	62.5 b

A diferença nos quantitativos proteicos mantém-se ao longo do processo de aclimação, continuando a verificar-se valores estatisticamente significativos ao fim de 30 semanas de aclimação

#### 4.3 · Teor em Pigmentos Fotossintéticos

O teor em clorofila total foi determinado em plantas com 8-25 semanas de ensaio de micorrização (Tabela 3), e de pigmentos fotossintéticos em plantas com 20, 30 e 40 semanas de aclimação (figura 9).

Os valores obtidos não nos permitem tirar uma conclusão segura do efeito da micorrização no teor de pigmentos fotossintéticos, uma vez que as diferenças registadas não são estatisticamente significativas, à excepção do valor de clorofila total às 25 semanas de ensaio que é significativamente superior em plantas testemunha (Tabela 3).

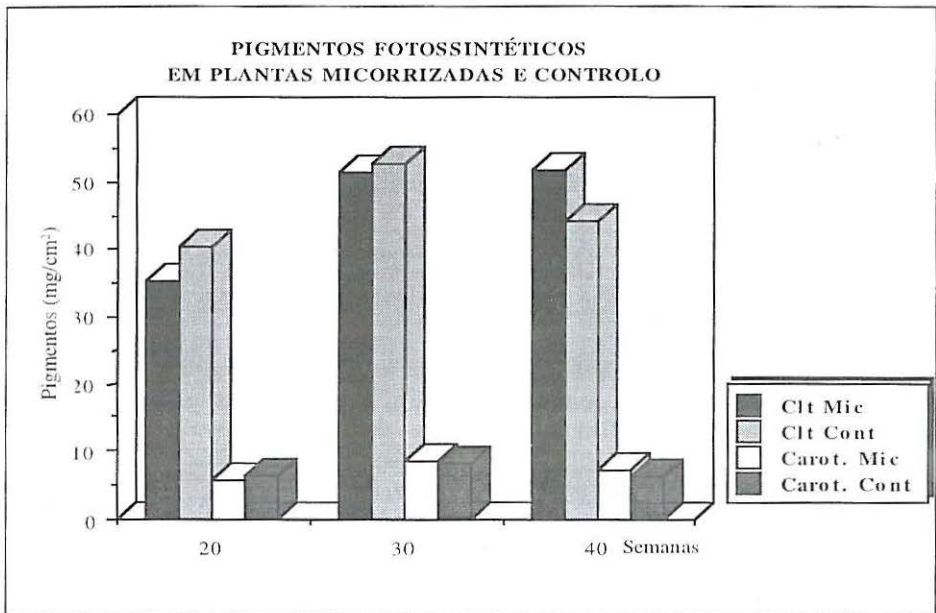
**Tabela 3** - Teores de clorofilas de plantas micorripagadas e testemunha. Valores seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes a  $P < 0.05$ .

Teores de clorofila total (mg/cm <sup>2</sup> )					
	8 semanas	10 semanas	12 semanas	14 semanas	25 semanas
Mic	23.9 a	25.0 a	26.0 a	29.2 a	35.0 a
Test	23.8 a	23.5 a	21.6 a	25.2 a	40.2 b

Apesar disso, verifica-se uma modificação do padrão de pigmentos ao longo do processo de aclimação das plantas. Deste modo, podemos observar que os valores obtidos para cada um dos pigmentos para 20 semanas são superiores em plantas testemunha. Para 30 semanas, os valores aproximam-se nos dois grupos de plantas, invertendo-se esta relação, nas plantas com 40 semanas de aclimação (figura 9).

#### 4.4 · Parâmetros Fotossintéticos e Respiratórios

Os resultados obtidos para as taxas fotossintéticas e respiratórias, revelam a existência de diferenças significativas nestes parâme-



**Figura 9** - Teores de pigmentos fotossintéticos: clorofila total e carotenóides em plantas micorrizadas (Clt Mic e Carot Mic) e testemunhas (Clt Cont e Carot Cont) com 20, 30 e 40 semanas de aclimação.

tros, entre plantas micorrizadas e não micorrizadas, como pode ver-se pelos resultados apresentados nas tabelas 4 e 5.

As taxas fotossintéticas são superiores em plantas micorrizadas, sendo essa diferença estatisticamente significativa para tempos de micorrização iguais ou superiores a 12 semanas ( $P < 0.05$ ) (tabela 4).

As taxas respiratórias das plantas testemunha, por sua vez, são muito superiores às das plantas micorrizadas (tabela 5). As diferenças encontradas são muito significativas a partir das 10 semanas de ensaio, quando expressas em unidade de área ( $P < 0.01$ ), e altamente significa-

**Tabela 4** - Taxas fotossintéticas de plantas micorrizadas com *Pisolithus tinctorius* e plantas testemunha (Test). Valores seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes a  $P < 0.05$ .

Taxas Fotosintéticas

( $\mu\text{l CO}_2/\text{cm}^2$ ) / ( $\text{ml CO}_2/\text{g}$ )

	8 semanas			10 semanas			12 semanas			14 semanas		
	/Area	/Pf	/Ps	/Area	/Pf	/Ps	/Area	/Pf	/Ps	/Area	/Pf	/Ps
Mic	28.9a	2.0 a	12.2a	37.8 a	2.7 a	14.8a	36.1a	2.6 a	15.8 a	41.6a	2.9 a	17.8a
Test	23.3a	1.8 a	11.1a	34.0 a	2.5 a	16.0a	19.4b	1.4 b	8.3 b	26.7b	1.8 b	10.8b

tivas quando expressas em peso fresco e peso seco ( $P < 0.001$ ).

Além dos valores das taxas fotossintéticas e respiratórias, também as diferenças encontradas nos valores dos pontos de compensação de  $\text{CO}_2$ , mais baixos nas plantas micorrizadas, se revelaram altamente significativos para os dois grupos de plantas ( $P < 0.001$ ) (tabela 6).

**Tabela 5** - Taxas respiratórias de plantas micorrizadas com *Pisolithus tinctorius* e plantas testemunha. Valores seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes a  $P < 0.05$ .

Taxas Respiratórias

( $\mu\text{l CO}_2/\text{cm}^2$ ) / ( $\text{ml CO}_2/\text{g}$ )

	8 semanas			10 semanas			12 semanas			14 semanas		
	/Area	/Pf	/Ps	/Area	/Pf	/Ps	/Area	/Pf	/Ps	/Area	/Pf	/Ps
Mic	16.1a	1.0a	6.1a	10.1a	0.7a	4.0a	13.1a	0.9a	5.4a	13.9a	0.6a	3.5a
Test	16.8a	1.3b	7.6b	23.5b	1.7b	10.9b	27.1b	2.0b	11.6b	17.0a	1.2b	7.2b

**Tabela 6** - Ponto de Compensação de  $\text{CO}_2$  de plantas micorrizadas com *Pisolithus tinctorius* e plantas testemunha. Valores seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes a  $P < 0.05$ .

Ponto de Compensação de  $\text{CO}_2$  (ppm  $\text{CO}_2$ )

	8 semanas	10 semanas	12 semanas	14 semanas
Mic	173.0 a	110.0 a	121.1 a	130.0 a
Test	250.0 b	222.5 b	288.0 b	187.5 b

#### 4.5 • Actividade da RuBisCO

A actividade da RuBisCO foi determinada, à semelhança do que aconteceu com as quantificações anteriores de proteína e pigmentos fotossintéticos, em plantas com 8 e 14 semanas de micorrização, antes da passagem a aclimação e em plantas com 25 semanas de micorrização e 12 semanas de aclimação.

Verificaram-se diferenças de actividade de RuBisCO entre plantas micorrizadas e não micorrizadas idênticas para todos os tempos de micorrização, apesar de exibirem diferenças em valor absoluto. Apresentando as plantas mais jovens, antes da aclimação, actividades de RuBisCO muito inferiores às plantas com 25 semanas de aclimação. Na tabela 7 apresentam-se os valores obtidos para a actividade da RuBisCO em plantas com 8, 14 e 25 semanas de micorrização.

Verificamos que a actividade da Rubisco é superior em plantas micorrizadas para todos os casos, quando os resultados são expressos em peso fresco e peso seco, com diferenças estatisticamente significativas (tabela 7). Quando os resultados são expressos em proteína, porém, os valores aproximam-se, chegando mesmo a coincidir. Quando a actividade enzimática é expressa em termos de clorofila, verificam-se diferenças entre plantas micorrizadas e testemunha, mas não tão acentuadas como as verificadas para os valores expressos em peso fresco e seco (tabela 7).

**Tabela 7** - Actividade da Rubisco em plantas micorrizadas (Mic) e testemunha (Test). Valores seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes a  $P < 0.05$ .

Actividade da Rubisco ( $\mu\text{mol CO}_2/\text{g/h}$ ) / ( $\mu\text{mol CO}_2/\text{g/h}$ ) / ( $\mu\text{mol CO}_2/\text{mg/h}$ ) / ( $\mu\text{mol CO}_2/\text{mg/h}$ )												
	8 semanas				14 semanas				25 semanas			
	/Pf	/Ps	/Prot	/clor.	/Pf	/Ps	/Prot	/clor.	/Pf	/Ps	/Prot	/clor.
Mic	92.8 a	545.7 a	5.6 a	41.0 a	107.4 a	667.0 a	9.7 a	25.3 a	333.0 a	2497.5 a	22.4 a	72.5 a
Test	76.4 b	449.2 b	5.3 a	34.1 a	95.7 a	598.1 b	9.7 a	18.6 b	267.0 b	1949.1b	20.5 a	68.5 a

## V · Discussão e Conclusões

---

A metodologia de micorrização utilizada na primeira parte deste trabalho, mostrou-se pouco eficaz mesmo com elevados tempos de micorrização. O grande volume de substrato utilizado, bem como o facto de se ter procedido à inoculação simultânea de fungo e plantas, são provavelmente responsáveis pelos elevados tempos de micorrização, uma vez que o fungo demorava um tempo excessivamente longo a colonizar o substrato. A redução do volume e a inoculação prévia do substrato levou a uma redução significativa do tempo de micorrização, o que nos parece dar consistência à hipótese formulada.

As micorrizas obtidas com *P. tinctorius* apresentaram um manto fúngico e rede de Hartig que, tal como referem Harley & Smith (1983), não ultrapassa as células corticais. As raízes laterais exibem ramificação dicotômica resultante da dicotomização sucessiva do meristema radicular, que lhes confere uma morfologia piramidal ou coralóide (Rancillac, 1983). A ausência de pêlos radiculares e o alongamento transversal das células epidérmicas são outras características morfológicas das raízes micorrizadas obtidas. Esta morfologia foi observada mesmo nas raízes que não estavam em contacto com o fungo, não aparecendo nas raízes das plantas testemunha. A maior dicotomização das raízes de *C. sativa* Mill., encontrada em micorrizas de *P. tinctorius*, coincidem com aspectos de micorrização mais eficaz. Segundo Frankenberger & Poth, (1987), as auxinas produzidas pelo fungo são directamente responsáveis pelos aspectos observados. Rupp & Mudge (1985),

no entanto, afirmam que estas têm somente um papel indirecto, pois é o etileno produzido pela raiz em resposta à produção de auxinas do fungo, o responsável pela morfologia das micorrizas. Estes autores observaram uma inibição do papel das auxinas quando da aplicação de inibidores da acção do etileno. Não foram determinados os níveis de fitorreguladores nas raízes estudadas, mas o aumento de ramificação das raízes laterais verificado nas plantas micorrizadas de *C. sativa*, pode justificar-se com base nestas observações e nas de numerosos autores, que o atribuem à acção (directa ou indirecta) de fitorreguladores produzidos pelos fungos micorrízicos (Harley & Smith, 1983; Rupp & Mudge, 1985; Barea, 1986; Gay, 1986; Frankenberger & Poth, 1987; Gay et al., 1994; Smith & Read, 1997).

Apesar da baixa especificidade atribuída aos fungos ectomicorrízicos (Dudridge, 1986), os fungos *A. muscaria*, *L. laccata*, *P. croceum* e *P. tinctorius* revelaram diferentes capacidades de associação com as raízes de castanheiro *in vitro*. Não foi possível a associação com *P. croceum*; e *L. laccata* e *A. muscaria* mostraram baixa capacidade de associação, enquanto *P. tinctorius* se revelou o mais eficaz.

À semelhança do que acontece com o crescimento dos fungos em meio sólido, também a capacidade de crescimento dos fungos no substrato de micorrização pode ser diferente para cada um destes, podendo esta diferença ser determinante da capacidade de infecção. *P. tinctorius*, que revelou maior capacidade de infecção, foi também o que apresentou maior aptidão para crescer em cultura. Estes resultados estão de acordo com as numerosas referências à aptidão deste fungo para se associar com grande número de espécies florestais. No entanto, não estão esclarecidos os factores que intervêm nas diferenças de comportamento dos fungos micorrízicos em relação à infecção (Malajczuk et al., 1984, Malajczuk et al., 1990).

A diferente especificidade das espécies fúngicas, bem como a incompatibilidade de alguns fungos para determinadas plantas, foi previamente reconhecida por Malajczuk et al., (1984). Segundo estes autores existe incompatibilidade entre *Eucalyptus* e fungos reconhecidos como micorrízicos específicos de coníferas. Esta revela-se pela incapacidade do fungo penetrar entre as células, apesar de envolver as raízes com um manto frequentemente incipiente e heterogéneo. A deposição de taninos nas células epidérmicas é também interpretada como uma provável reacção de incompatibilidade. A lise das células epidérmicas e do fungo, foi ainda observada nalguns casos (Malajczuk et al., 1984). Segundo Malajczuk et al., (1990) ocorrem mesmo diferenças na capacidade de infecção entre isolamentos diferentes de uma mesma espécie fúngica. Duas estirpes de *P. tinctorius*, revelaram diferentes capacidades de infecção para o eucalipto, sendo mais eficaz o fungo isolado em povoamentos desta espécie florestal. A micorrização obtida em *C. sativa* foi diferente na extensão e características das micorrizas formadas. Enquanto *P. tinctorius* formou micorrizas com idêntica morfologia e extensão, para um determinado tempo de micorrização, *L. laccata* e *A. muscaria* infectaram extensões reduzidas das

raízes e apresentaram micorrizas de grande heterogeneidade morfológica (mantos de espessura variável e ausência frequente de rede de Hartig), o que sugere que nas condições testadas, estas apresentaram uma baixa eficiência de micorrização. No caso de *L. laccata* verificou-se ainda o rompimento frequente do manto na região apical da raiz. Segundo Harley & Smith (1983), o rompimento do manto ocorre naturalmente em fases de crescimento acelerado das raízes, até ao restabelecimento do estado de micorrização. Em *C. sativa* parece corresponder a uma reduzida eficiência de micorrização por parte do fungo, pois ocorre com frequência muito elevada e exclusivamente com *L. laccata*. Não foram observadas raízes longas e hialinas com ápices cónicos, como as descritas por Harley & Smith (1983), características das fases de crescimento acelerado. Ao contrário apresentavam ramificações arredondadas e curtas, mesmo quando não micorrizadas.

As baixas percentagens de plantas micorrizadas sobreviventes, antes do processo de aclimação confirmam a baixa capacidade de infecção de *L. laccata* e *A. muscaria*, ao mesmo tempo que mostram o papel da micorrização na capacidade de sobrevivência das plantas. A percentagem de sobrevivência das plantas micorrizadas com qualquer dos fungos micorrízicos ao fim de trinta semanas, é bastante superior à das plantas não micorrizadas, apesar de ser significativamente maior em *P. tinctorius* e muito baixa em todos os casos. Estas baixas taxas de sobrevivência resultantes da utilização da metodologia da fase I, parecem poder explicar-se pelas condições de stress nutritivo e hídrico a que as plantas estiveram sujeitas, dado o tempo excessivamente longo em ambiente confinado durante o processo de indução da micorrização. Os germinantes dado que lhe foram retirados os cotilédones, revelaram deficiência nutricional semelhante às plantas micropropagadas. As condições axénicas, com humidades relativas muito elevadas, condicionaram ainda a sua ulterior susceptibilidade ao stress hídrico. As condições ambientais testadas, por serem semelhantes às do crescimento das plantas micropropagadas, permitem comparar com menores distorções o comportamento durante a micorrização. Os resultados obtidos não mostram diferenças de comportamento em relação à micorrização, entre os germinantes e as plantas micropropagadas. As percentagens de sobrevivência dos dois tipos de plantas, quando micorrizadas, são semelhantes, apesar de ligeiramente superiores nos germinantes. No caso de ausência de micorrização, porém, as diferenças são bastante maiores, sendo as taxas de sobrevivência superiores em germinantes (19.4% germinantes testemunhas, 9.1% micropropagadas testemunhas).

A micorrização parece pois mais determinante da sobrevivência de plantas micropropagadas do que de germinantes. Com efeito, o sistema radicular das plantas micropropagadas apresenta baixa funcionalidade na absorção de água e nutrientes durante as primeiras fases de desenvolvimento *ex-vitro* (Bonga, 1977; Flick *et al.*, 1983). Os resultados obtidos parecem apoiar a hipótese de que a micorrização pode aumentar a eficiência de absorção das raízes obtidas nas plantas micropropagadas, facilitando a aclimação nestas plantas e determinando

maior capacidade de sobrevivência.

Com qualquer dos fungos testados, a morfologia das micorrizas formadas em plantas micropropagadas é semelhante à de germinantes. As raízes de plantas micropropagadas obtidas em cultura, porém, nunca se apresentam micorrizadas. A micorrização ocorre sempre nas raízes formadas depois de contacto com o fungo. Estas observações, se por um lado confirmam a baixa funcionalidade para a micorrização das raízes obtidas *in vitro*, por outro evidenciam o papel positivo do contacto do fungo no desenvolvimento radicular.

Ao contrário do que acontece com as raízes micorrizadas de plantas micropropagadas e germinantes, verificam-se diferenças consideráveis entre a morfologia radicular de plantas testemunha germinantes e testemunha micropropagadas. Plantas testemunha micropropagadas apresentam, durante o período correspondente à micorrização, raízes pouco ramificadas evidenciando um crescimento lento ou nulo. Os germinantes possuem ramificações alongadas com ápice cónico, completamente cobertas de pelos absorventes, e evidenciam crescimento por alongamento, superior às respectivas plantas micorrizadas. Segundo Harley & Smith (1983), o crescimento de raízes não micorrizadas pode ser cinco vezes mais rápido que o das micorrizadas. No caso em estudo, esta diferença, verifica-se para germinantes, mas não para plantas micropropagadas.

A micorrização de plantas micropropagadas surge como uma forma de acelerar a funcionalidade das raízes, permitindo uma mais rápida formação de ramificações laterais, com concomitante aumento da eficiência de absorção. Este efeito, verificado também nos germinantes, surge no caso das plantas micropropagadas, com importância acrescida, pois permite ultrapassar, com maior facilidade a fase mais crítica do processo de micropropagação. A acção de auxinas produzidas pelo fungo, ou pela associação micorrízica (Harley & Smith, 1983; Gay, 1986; Frankenberger & Poth, 1987; Gay et al., 1994), ou ainda o efeito de compostos produzidos em resposta à síntese de auxinas (Rupp & Mudge, 1985), podem estar na base destes efeitos.

As diferenças encontradas para a capacidade de infecção dos vários fungos testados, condicionou o aprofundamento do estudo apenas com *P. tinctorius*, por ser o fungo que revelou as maiores taxas e extensões de associação, com consequente indução de maiores taxas de sobrevivência nas plantas micorrizadas. As consequências fisiológicas induzidas pela micorrização nas plantas micropropagadas foram também estudadas com este fungo.

A metodologia seguida na segunda fase do trabalho levou a uma redução significativa do tempo de micorrização. Esta metodologia foi possível dado que as plantas micropropagadas, únicas plantas usadas com esta metodologia, possuem, no momento de inoculação, dimensões inferiores aos germinantes. Na fase em que foram testados simultaneamente ambos os tipos de plantas, não foi possível optar por frascos de tão reduzidas dimensões, atendendo às maiores dimensões dos germinantes. A inoculação prévia dos substratos, em contrapartida, proporcio-

onou o desenvolvimento do fungo antes da transferência das plantas, sendo este, com grande probabilidade, responsável pela significativa redução do tempo de infecção das raízes.

As diferenças nas metodologias não condicionaram diferenças morfológicas das micorrizas formadas. No entanto, nas micorrizas formadas pela metodologia 2, para o mesmo tempo de ensaio, a extensão de associação foi muito superior. As plantas exibem, por isso, melhores condições fisiológicas, pois não são submetidas a condições de stress ambiental por um tão longo período, ao mesmo tempo que beneficiam, desde mais cedo, da associação micorrízica. Os valores de sobrevivência antes da aclimação são, por consequência, significativamente aumentados, quer para plantas micorrizadas, quer para as testemunhas.

As diferenças na extensão de micorrização entre as plantas de um mesmo frasco sugerem a existência de competição no mecanismo de associação simbiótica. O fungo infecta geralmente a planta de maior desenvolvimento radicular, provocando um acréscimo no desenvolvimento geral da planta que se acentua ao longo do tempo. As restantes plantas, apresentam também diferenças de micorrização entre si, verificando-se que a menos favorecida na associação é a de menor desenvolvimento radicular. Não é conhecido o mecanismo pelo qual se dá a associação diferencial de fungo às raízes de plantas em desenvolvimento num mesmo substrato. Segundo Nylund (1980) a ligação do fungo à epiderme da raiz do hospedeiro, depende da secreção de compostos de carbono por parte desta. Ao nível da raiz são exudados aminoácidos, proteínas, glúcidos, ácidos orgânicos e fitorreguladores que ao serem disponibilizados, condicionam o mecanismo de ligação do fungo às raízes, quando da associação micorrízica. A alteração da permeabilidade celular em resposta a condições ambientais como o balanço mineral e as concentrações de fitorreguladores, parece associada a este mecanismo de exudação (Barea, 1986). A micorrização das plantas estará condicionada pela translocação e disponibilização de compostos de carbono ao nível da raiz (Nylund, 1980; Barea, 1986) e será tanto mais eficiente quanto mais extensa e ramificada esta for. Os resultados encontrados sugerem que num mesmo substrato, a menor disponibilização de nutrientes por parte de plantas com desenvolvimento radicular inferior, poderá estar na base das diferenças na extensão de micorrização. As plantas com maior desenvolvimento radicular possuem vantagem para a micorrização, sendo preferidas pelo fungo ao qual fornecem maiores quantidades de nutrientes.

Após micorrização, quer as plantas micropropagadas, quer os germinantes apresentaram taxas de crescimento em altura superiores às respectivas testemunhas. Efeito idêntico foi descrito por vários autores (Harley & Smith, 1983; Grellier *et al.*, 1984). Os benefícios causados pela micorrização têm sido amplamente referidos (Ashford *et al.*, 1975; Mejstrik, 1975; Harley & Smith, 1983; Lapeyrie *et al.*, 1984; Rolin *et al.*, 1984; Martín *et al.*, 1985; Ronald & Söderhäll, 1985; Ingestad *et al.*, 1986; Bougher *et al.*, 1990; Cumming & Weinstein, 1990; Jones *et al.*, 1990; Scheromm *et al.*, 1990a,b; Brundrett *et al.*, 1996; Smith & Read,

1997), sobretudo no que se refere à capacidade de mobilizar nutrientes disponíveis no solo em quantidades limitantes do crescimento (nomeadamente P, N e K). Estes benefícios nutricionais nem sempre são acompanhados por um incremento das taxas de crescimento das plantas, havendo mesmo autores que referem o efeito contrário (Harley & Smith, 1983). Segundo estes autores, nalguns casos, o suprimento de compostos de carbono requerido pelo fungo, não permite ao hospedeiro incrementar a sua biomassa, apesar da disponibilização de nutrientes que este lhe proporciona (Harley & Smith, 1983).

Os acréscimos em altura de castanheiros germinantes micorizados são tanto mais significativos quanto maior a eficiência de micorrização do fungo. Existem diferenças no crescimento entre as plantas micorrizadas com cada um dos fungos micorrízicos, que por sua vez são diferentes das taxas de crescimento das plantas testemunha. *P. tinctorius* revelou-se o fungo mais eficiente no estímulo do crescimento de plantas micorrizadas, sendo seguido por *A. muscaria* e *L. laccata*. Estes resultados coincidem com os obtidos para a capacidade de associação de cada um dos fungos, verificando-se uma relação entre capacidade de micorrização, extensão de associação de um fungo e eficiência fisiológica dessa mesma associação. Em relação às plantas micropropagadas, este efeito é ainda mais pronunciado. As plantas micropropagadas exibem taxas de crescimento em altura, em área foliar e ainda número de folhas, significativamente superiores às respectivas testemunhas. Estes resultados evidenciam o efeito positivo da micorrização no crescimento das plantas, e são o reflexo do efeito verificado também nos parâmetros fisiológicos. Segundo Harley & Smith (1983), a observação de um número mais elevado de folhas em plantas micorrizadas, não permite estabelecer uma correlação directa entre micorrização e este parâmetro de crescimento. As plantas estudadas são de um modo geral geneticamente diferentes, podendo essas diferenças dever-se fundamentalmente a esse facto. Tendo em conta que o presente trabalho foi realizado com plantas uniformes geneticamente, e que as plantas micorrizadas exibem em todos os casos maior número de folhas, as observações referidas por aqueles autores, sugerem a possibilidade de que tal correlação possa existir.

Uma vez que o número total de folhas é maior em plantas micorrizadas para cada um dos tempos de medição, a área foliar superior nestas plantas poderia decorrer exclusivamente desse facto. Calculando a área foliar por folha verifica-se que, também esta, é significativamente mais elevada em plantas micorrizadas. A área foliar destas plantas, é superior à das testemunhas, não só devido ao maior número de folhas, como também à maior área de cada uma delas. As plantas com 4-10 semanas de micorrização, antes da passagem a aclimação, exibem já áreas foliares por folha ligeiramente superiores aos testemunhas, evidenciando a mesma tendência revelada pelas plantas com 25 semanas de aclimação. Estes resultados sugerem desde logo uma maior eficiência dos parâmetros fisiológicos associados à área foliar, nomeadamente taxas fotossintéticas. As perdas de água pelas folhas, parâmetro

determinante das áreas foliares na maioria das espécies, parecem ser aqui compensadas, de alguma forma, com a presença do fungo, reforçando o papel deste na disponibilização de água para a planta (Hu, 1977; Duddridge *et al.*, 1980; Harley & Smith, 1983; Boyd *et al.*, 1986; Meyer, 1987; Feil *et al.*, 1988; Marx and Cordell, 1989; Guehl *et al.*, 1992)

As taxas de crescimento de plantas micropropagadas e germinantes, calculadas em termos dos valores absolutos de altura, para o mesmo tempo de aclimação, são muito diferentes entre si, quer nas plantas micorrizadas, quer nas plantas testemunha. Estes resultados evidenciam a conhecida superioridade de crescimento das plantas obtidas por micropropagação, em relação às obtidas por via germinal (Bajaj, 1986).

As relações peso seco/peso fresco determinadas em folhas de plantas micorrizadas e testemunha, em diferentes tempos de micorrização, não apresentam diferenças significativas entre os dois grupos de plantas, apesar dos valores serem ligeiramente superiores em plantas micorrizadas. Os valores obtidos para plantas com 25 semanas de aclimação e plantas imediatamente antes da aclimação, diferem em valor absoluto, mas os valores relativos em plantas micorrizadas e testemunha mantêm-se. Os valores determinados para raízes e caules nas plantas mais jovens, apresentam também este padrão. O acréscimo de biomassa destas plantas, dá-se por crescimento em altura e área foliar e não por aumento da relação peso seco/peso fresco pois as plantas micorrizadas (até às 25 semanas de micorrização) não apresentam significativas alterações da relação peso seco/peso fresco em relação às testemunhas.

Os valores determinados para a proteína solúvel em plantas micorrizadas, são significativamente diferentes dos encontrados para as plantas não micorrizadas da mesma idade. Este aumento do conteúdo proteico, pode dever-se ao aumento de absorção de azoto pelas micorrizas, verificado por numerosos autores (Harley & Smith 1983; Scherromm *et al.*, 1990). As micorrizas têm a capacidade de aumentar a absorção de compostos azotados, geralmente sob a forma de amónio, com conseqüente aumento das sínteses com eles relacionadas. O aumento de absorção de azoto foi referido por numerosos autores (Harley & Smith, 1983; Finlay, 1992; Finlay *et al.*, 1988; 1989; 1996; Scherromm *et al.*, 1990; Smith & Read, 1997) assim como o papel importante das ectomicorrizas na reciclagem de azoto nos ecossistemas florestais (Martin *et al.*, 1992). A síntese de compostos de azoto nas plantas micorrizadas de castanheiro, revelada num conteúdo proteico aumentado, sugere uma absorção mais eficiente de azoto por estas plantas, pois as plantas testemunha, tendo disponíveis as mesmas fontes de azoto, revelam conteúdos proteicos inferiores.

As taxas fotossintéticas obtidas nas plantas micorrizadas, quer expressas em unidade de área, quer em peso fresco, são muito superiores às das plantas testemunha. Estes valores evidenciam uma activação do metabolismo fotossintético, tal como acontece para outras plantas micorrizadas (Reid *et al.*, 1983; Lewis, 1986; Dosskey *et al.*,

1990) e segundo estes autores reflectem uma resposta à associação, uma vez que a planta sintetiza a fonte de carbono que fornece ao fungo.

Sabe-se que os transportes de carbono e fósforo estão intimamente relacionados em termos de taxas fotossintéticas e de transporte dos produtos da fotossíntese a nível do invólucro cloroplastidial. Deste modo, uma alta concentração citoplásmica de Pi, está funcionalmente relacionada com altas taxas fotossintéticas, com transporte de trioses para o exterior do cloroplasto e com baixas acumulações de amido. A velocidade de síntese de sacarose no citoplasma, controla a velocidade de translocação de produtos para os tecidos receptores e é tanto maior, quanto maior a síntese de trioses (Lewis, 1986). Este papel do Pi foi demonstrado, procedendo ao seu aprisionamento sob a forma orgânica, em análogos de glucose não metabolizáveis. Provocou-se desta forma um abaixamento de concentração de Pi a nível do citoplasma, verificando-se, como consequência, o decréscimo das taxas fotossintéticas e da exportação de compostos de carbono do cloroplasto, o aumento da síntese de amido, o decréscimo da síntese de sacarose e consequentemente o decréscimo da velocidade de translocação. Este efeito é semelhante ao provocado pela deficiência de fósforo em condições naturais (Lewis, 1986).

A taxa fotossintética está pois, dependente do nível de fósforo citoplasmático. Os resultados por nós obtidos para as taxas fotossintéticas em plantas micorrizadas sugerem indirectamente, o aumento da eficiência de absorção de P pelas micorrizas de *C. sativa*, à semelhança do observado por outros autores (Ashford *et al.*, 1975; Lapeyrie *et al.*, 1984; Bougher *et al.*, 1990). O aumento verificado está dependente do aumento da concentração de Pi ao nível do citoplasma das células clorofilinas, do qual resulta a síntese e translocação permanente de compostos de carbono. O fungo micorrízico dispõe de uma disponibilização destes compostos, na sequência de fornecimento contínuo de Pi à planta. Não se verifica acumulação de amido, pois a planta tem sempre disponível Pi em quantidade suficiente para as fosforilações requeridas ao seu metabolismo. Esta inferência é apoiada pelas observações em plantas micorrizadas de *Pinus taeda*, em que aumentos das taxas fotossintéticas são acompanhados por concentrações superiores de N e P a nível das folhas (Reid *et al.*, 1983). Seria necessário no entanto, confirmar a existência de concentrações de fósforo superiores em plantas micorrizadas de *C. sativa*, para podermos afirmar ser este o mecanismo que explica as taxas fotossintéticas mais elevadas em plantas micorrizadas de *C. sativa*.

As taxas fotossintéticas quer expressas em termos de áreas foliares ou peso fresco, são maiores em plantas micorrizadas que nas testemunhas. Estes valores evidenciam a activação do metabolismo fotossintético como resposta à associação simbiótica, sendo os compostos de carbono fornecidos ao fungo como foi sugerido por Reid *et al.*, (1983), Lewis (1986), Söderström *et al.*, (1987, 1988) e Dosskey *et al.*, (1990). Estes compostos de carbono são usados para manter a biomassa fúngica existente nas raízes micorrizadas, na rede de micélio do solo e

ainda para a produção de nova biomassa (Söderström, 1992). O transporte de carbono para o solo através da rede micorrízica de micélio, deve ser de considerável importância ecológica, uma vez que há um considerável requerimento de carbono pelo solo (Söderström, 1992). Segundo Söderström (1992) os fungos micorrízicos podem contribuir com cerca de 40% de carbono extra para o solo, quando comparado com o contributo da manta morta. Isto representa uma proporção significativa da quantidade assimilada pelas plantas, mas pode também contribuir para a vida saprofítica no solo (Söderström, 1992). Como foi determinado por Lewis & Harley (1965a, b) usando micorrizas isoladas de bétula, compostos de carbono, na sua maioria sob a forma de sacarose, movem-se da planta para a massa fúngica do manto, onde são rapidamente convertidos em intermediários metabólicos, dos quais a trealose e o manitol são dominantes (Söderström *et al.*, 1988).

Embora não sendo estatisticamente significativas as diferenças encontradas para os pigmentos fotossintéticos determinados em plantas às 20, 30 e 40 semanas de aclimação, estes apresentam diferenças entre plantas micorrizadas e não micorrizadas ao longo do tempo. Estes resultados sugerem que as diferenças encontradas nos valores de pigmentos fotossintéticos, ao longo do processo de aclimação, estão relacionados com a necessidade, por parte das plantas testemunha, de maiores conteúdos de pigmentos fotossintéticos como forma de garantir a adaptação a condições de autotrofismo, sem o suprimento de nutrientes que as micorrizas proporcionam às restantes plantas.

As plantas micorrizadas apresentam taxas respiratórias mais baixas que as respectivas testemunhas. Estes resultados sugerem a existência de uma maior produtividade em plantas micorrizadas. Não nos é possível por enquanto explicar estas diferenças, no entanto, poderá admitir-se um efeito das micorrizas na disponibilização de alguns nutrientes a nível do solo (P, N, K), que permitem à planta economizar energia, induzindo assim um metabolismo respiratório menos activo que o das plantas testemunha.

As diferenças encontradas para os pontos de compensação de  $\text{CO}_2$ , sugerem diferenças importantes nos parâmetros fotossintéticos e respiratórios das plantas micorrizadas e não micorrizadas. Com efeito, as plantas micorrizadas apresentam pontos de compensação 42.9% mais baixos em média, que as plantas testemunha. O ponto de compensação, é a concentração de  $\text{CO}_2$  em que a quantidade deste gaz fixada pela fotossíntese iguala a que se liberta na respiração, pelo que podemos afirmar que reflecte a grandeza da fotorrespiração, desde que se admita que a respiração às escuras é desprezável (Osmond, 1981; Teixeira & Pinto Ricardo, 1983; Coombs, 1987). Os pontos de compensação encontrados em plantas micorrizadas, sugerem a existência de um mecanismo fotorrespiratório menos activo nestas plantas, com consequente acréscimo das taxas fotossintéticas para concentrações mais baixas de  $\text{CO}_2$ . Tendo em conta que a fotorrespiração é um mecanismo dissipador (Osmond, 1981), tanto do potencial reductor, como da energia

produzidos pela fotossíntese (Teixeira & Pinto Ricardo, 1983), um decréscimo neste mecanismo implicaria um ganho considerável para a planta. Não poderemos neste caso deixar de ter em conta que os resultados obtidos para este parâmetro, reflitam diferentes capacidades de resposta das plantas micorrizadas e testemunha às condições de *stress* ao longo da medição das taxas fotossintéticas e respiratórias. Com efeito, a metodologia utilizada, implica a abaixamento progressivo da humidade relativa (HR) dentro dos frascos, por retenção de humidade quando da circulação do ar através do IRGA. Este abaixamento da HR implica, por certo, uma necessidade de regulação estomática por parte das plantas, que será tanto mais necessária, quanto maior o *stress* que esse abaixamento lhes venha a provocar. Deste modo, os resultados obtidos, parecem sugerir que em plantas micorrizadas, o *stress* hídrico se faz sentir menos, podendo estas manter os estomas abertos, em condições de humidade nas quais as plantas testemunha necessitam fechá-los, podendo desta forma realizar fotossíntese em níveis de CO<sub>2</sub> mais baixos.

Os valores encontrados para a actividade da RubisCO, não revelam diferenças significativas entre plantas micorrizadas e testemunhas, apesar destes apresentarem valores mais baixos que as plantas micorrizadas, quando determinados em função do peso fresco e de clorofila. Quando expressos em quantidade de proteína porém, os valores de actividade aproximam-se, chegando mesmo a coincidir. Os resultados evidenciam ainda diferenças significativas de actividade da RuBisCO com a idade da planta entre as quinze e as 25 semanas de micorrização. No entanto não se verificaram diferenças entre as plantas com 8-15 semanas. Estes resultados sugerem que o acréscimo de actividade enzimática se deve ao acréscimo na quantidade de proteína verificado nestas plantas. Com base neste pressuposto, as plantas micorrizadas apresentariam uma maior quantidade de RuBisCO. No entanto se atentarmos no facto, de que este acréscimo pode não ser devido a um aumento geral das proteínas da planta, mas ao aparecimento de proteínas específicas da simbiose, estes resultados de actividade da RuBisCO, poderiam aparecer mascarados quando expressos em proteína.

A análise dos resultados obtidos, permite-nos afirmar que a micorrização não só permite o aumento da sobrevivência das plantas micropropagadas, antes e durante o processo de aclimação às condições *ex-vitro*, como também cria condições (nutricionais e/ou outras) favoráveis ao desenvolvimento subsequente. Os diferentes parâmetros analisados, sugerem que as alterações metabólicas induzidas na sequência da micorrização condicionam um aumento da biomassa fúngica, ao mesmo tempo que permitem um aumento da biomassa total da planta micorrizada, tal como observado por diferentes autores para outras associações micorrízicas (Harley & Smith, 1983).

## Bibliografia

---

- Alvarez, I., 1984: Hongos ectomicorrícicos de *Castanea*. Congr. Int. sobre el Castaño. 1-5 Octubre 1984. Lourizán. Pontevedra. pp. 243-249. In : Nazaré-Pereira, 1987.
- Ashford, A.E., Ling Lee, M., Chilvers, G.A., 1975: Polyphosphate in eucalypt mycorrhizas: a cytochemical demonstration. *New Phytol.* **74**: 447-453.
- Azevedo, J., 1989: Inventário de macrofungos em povoamentos de *Castanea sativa* em Trás - os - Montes e Alto Douro. Relatório final de Estágio. Universidade de Trás - os - Montes e Alto Douro. Vila Real.
- Azevedo, N.F., 1973: Micorrizas e doenças. *Bol.Soc.Broteriana.* **47**: 337-346.
- Bajaj, Y.P.S., 1986: Biotechnology of Tree Improvement for Rapid Propagation and Biomass Energy Production. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry 1 - Trees I*, pp 1-23.
- Barea, J.M., 1986: Importance of hormones and root exudates in mycorrhizal phenomena. In *Mycorrhizae: Physiology and Genetics*. pp.177-187. 1st European Symposium on Mycorrhiza

- ESM, Dijon, 1-5 July 1985 - INRA, Paris, 1986
- Barroso, J.M.G., 1988: Micorrizas em *Ophrys lutea* Cav.: Aspectos citológicos, citoquímicos e bioquímicos da interacção hóspede/hospedeiro. Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Biologia (Biologia Celular). Faculdade de Ciências de Lisboa.
- Barsali, E., 1922: Contribuzione allo studio del rapporti delle micorize ectrofiche di alcune essenze arboree. *Atti. Soc. Toscana Sci. Nat. Proc. Verb.* **31**, 16-20. In: Nazaré-Pereira.
- Bergougnot, F.; Verlhac, A., 1978: Le Chataignier, Production et Culture. INVUFLEC, CNICM, INRA. France.
- Bigg, W.L., 1981: Some effects of nitrate, ammonium and mycohhizal fungi on the growth of Douglas fir and Sitka spruce. Ph.D. Thesis. Aberdeen University. In: Harley and Smith, 1983.
- Biondi, S., Canciani, L. De Paoli, G., Bagni, L., 1981: Shoot formation from bud cultures of mature chestnut. In: *Colloque Internationale sur la Culture In Vitro Des Éssences Forestières - AFOCEL IUFRO*, Fontainebleau. 181-185.
- Bonga, J.M., 1977: Applications of tissue culture in forestry. In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* J. Reinert and Y.P.S. Bajaj, eds. Springer-Verlag, New York. pp. 93-107.
- Bonga, J.M., 1987: Clonal Propagation of Mature Trees: Problems and Possible Solutions. In: *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Vol. 1. General Principles and Biotechnology. J.M. Bonga and Don Durzan Eds. Martinus Nijhoff. pp. 249-271.
- Bougher, N.L., Grove, T.S., Malajczuk, N., 1990: Growth and phosphorus acquisition of karri (*Eucalyptus diversicolor* F. Muell.) seedlings inoculated with ectomycorrhizal fungi in relation to phosphorus supply. *New Phytol.*: 77-85.
- Bradford M.M., 1976: A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**: 248-254.
- Brown, T.M., Wilkins, D.A., 1985: Zinc tolerance of mycorrhizal *Betula*. *New Phytol.*, **99**: 101-106.
- Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., Malajczuk, N., 1996: Working with mycorrhizas in Forestry and Agriculture. ACIAR Monograph 32. 374+xp.
- Callonge, F.D., 1975: Hongos de nuestros campos y bosques. *Min. Agric. Madrid*. 388p. In: Nazaré-Pereira.
- Carrodus, B.B., 1965: Absorption and assimilation of nitrogen com-

- pounds by mycorrhiza . D. Phil. Thesis, Oxford University, Oxford. *In*: Harley and Smith, 1983.
- Carrodus, B.B., 1966: Absorption of nitrogen by mycorrhizal roots of beech. I. Factors affecting assimilation of nitrogen. *New Phytol.*, **65**: 358-371.
- Carrodus, B.B., 1967: Absorption of nitrogen by mycorrhizal roots of beech. I. Ammonium and nitrate sources of nitrogen. *New Phytol.*, **66**: 1-4.
- Ceruti, A., 1965: La tartuficoltura in Italia. *Ann. Acad. Agr. Torino*, **107**, 1-12. *In*: Nazaré-Pereira, 1987.z
- Chevalier, G.; Grente, G.J.; Garbaye, J.; Ferrapy, I.; Rodary, C., 1978: Mycorrhizal synthesis between truffle (*Tuber melanosporum* Vitt.) and rooted cuttings of sessile oak (*Quercus petrae* M. Liebl.) and chestnut-tree (*Castanea sativa* Mill.) IUFRO Congress, Nancy. *In*: Nazaré-Pereira, 1987.
- Chevassut, G., 1976: Quatre amanites comestibles de notre region. *Ann. Soc. d'Hort. et d'Hist. Natrelle de l'Hérault*. **116**, 104-106.
- Chevassut, G.; Lecot, G., 1976: Les quatre cèpes du groupe *edulis* en Languedoc-Cèvennes. *Ann. Soc. d'Hort. et d'Hist. Natrelle de l'Hérault*. **116**, 149-152.
- Chèvre, A.M., 1985: Recherches sur la multiplication végétative *in vitro* chez le chataignier. Thèse Doc.Univ. Bordeaux.
- Chèvre, A.M., Gill, S.S., Mouras, A., Salesses, G., 1983- *In vitro* végétative multiplication of chestnut. *J. Hort. Sci.* **58**: 23-29.
- Chilvers, G.A.; Gust, L.W., 1982a: The development of mycorrhizal populations on pot-grown seedlings of *Eucalyptus St. Johnii* . R.T. Bok. *New Phytol.*, **90**: 667-679.
- Chilvers, G.A.; Gust, L.W., 1982b: Comparisons between growth rates of mycorrhizas of mycorrhizas, uninfected roots and mycorrhizal fungus of *Eucalyptus St. Johnii* . R.T. Bok. *New Phytol.*, **91**: 453-456.
- Clowes, F.A.L., 1951: The structure of mycorrhizal roots of *Fagus sylvatica*. *New Phytol.* **50**: 1-16.
- Cooke, R., 1977: Ectomycorrhizas. *In: The Biology of Symbiotic Fungi*.. John Wiley & Sons, London & Toronto. pp. 185-202.
- Coombs, J., 1987: Carbon Metabolism *In: Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis*.. Edited by: J.Coombs, D.O. Hall, S.P. Long, J.M.O. Scurlock 2nd Edition. 139-157
- Cromer, D.A.N., 1935: The significance of the mycorrhiza of *Pinus*

- radiata*. *Bull. Forest Bur. Australia*. **16**: 1-19. In: Harley and Smith, 1988.
- Cumming, J.R., Weinstein, L.H., 1990: Utilization of  $AlPO_4$  as a phosphorus source by ectomycorrhizal *Pinus rigida* Mill. seedlings, *New Phytol.* **116**: 99-106.
- David, A., Faye, M., Rancillac, M., 1983: Influence of auxin and mycorrhizal fungi on the *in vitro* formation and growth of *Pinus pinaster* roots. *Plant and Soil*. **71**: 501-505.
- Dicionário da História de Portugal, 1971. Direcção: Joel Serrão. 1ª edição, Vol. I, Porto.
- Dixon, R.K., 1988: Response of ectomycorrhizal *Quercus rubra* to soil cadmium, nickel and lead. *Soil Biol. Biochem.* **20** (4): 555-559.
- Donner, B.; Heyser, W., 1989: Buchenmykorrhizen: Möglichkeiten der Elementselektion unter besonderer Berücksichtigung einiger Schwermetalle. *Forstwissenschaftliches Zentralblatt*. **108**, 150-163. In: Väre, 1990.
- Dosskey, M.G.; Linderman, R.G.; Boersme, L., 1990: Carbon-Sink stimulation of Photosynthesis in Douglas Fir seedlings by some ectomycorrhizas. *New Phytol.*, **115**: 259-274.
- Doumas, P., Berjaud, C., Calléja, M., Coupé, M., Espiau, C., d'Auzac, J., 1986: Phosphatases extracellulaires et nutrition phosphatée chez les champignons ectomycorhiziens et les plantes hôtes. *Physiol. Vég.*, **24**, (2): 173-184.
- Duchesne, L.C., Peterson, R.L., Ellis, B.E., 1988: Pine root exudates stimulates the synthesis of antifungal compounds by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytol.* **108**: 471-476.
- Duddridge, J.A., 1980: A comparative ultrastructural analysis of a range of mycorrhizal associations. Ph. D. Thesis, University of Sheffield. In: Barroso, 1988.
- Duddridge, J.A., 1986: Specificity and recognition in mycorrhizal associations. In: *Proceedings of the 1st European Symposium on Mycorrhizae*. Dijon. Eds. Gianinazzi-Pearson. S. Gianinazzi. pp. 45-58.
- Duddridge, J.A., Read, D.J., 1984a: The development and ultrastructure of ectomycorrhizas. II. ectomycorrhizal development on pine *in vitro*. *New Phytol.* **96**: 575-582.
- Duddridge, J.A., Read, D.J., 1984b: Modification of the host-fungus interface in mycorrhizas synthesized between *Suillus Bovinus*

- (Fr.) O. Kuntz and *Pinus sylvestris* L.: *New Phytol.*, **96**: 583-588.
- Faye, M.; Rancillac, M.; David, A., 1980: Determinism of the mycorrhizogenic root formation in *Pinus pinaster* Sol. *New Phytol.* **87**: 557-565.
- Feil, W., Kottke, I., Oberwinkler, F., 1988: The effect of drought on mycorrhizal production and very fine root system development of norway spruce under natural and experimental conditions. *Plant and Soil.* **108**: 221-231.
- Feijó, J. A., 1989: Propagação *in vitro* de *Castanea sativa* Mill. Dissertação de Mestrado em Secreção Vegetal e Produtos Naturais Renováveis. Universidade de Lisboa.
- Finlay R.D. (1992): Uptake and translocation of nutrients by ectomycorrhizal fungal mycelia. In: Read DJ, Lewis DH, Fitter AH, Alexander IJ (eds). *Mycorrhizas in Ecosystems*. C.A.B. International. pp. 91-97.
- Finlay R.D., Ek H., Odham G., Söderstrom B. (1988): Mycelial uptake, translocation and assimilation of nitrogen from <sup>15</sup>N-labeled ammonium by *Pinus sylvestris* plants infected with four different ectomycorrhizal fungi. *New Phytol.* **110**: 59-66.
- Finlay R.D., Ek H., Odham G., Söderstrom B. (1989): Uptake, translocation and assimilation of nitrogen from <sup>15</sup>N-labeled ammonium and nitrate sources by intact ectomycorrhizal systems of *Fagus sylvatica* infected with *Paxillus involutus*. *New Phytol.* **113**: 47-55.
- Finlay R.D., Brun A., Chalot M., Söderstrom B. (1996): Interactions in the carbon and nitrogen metabolism of ectomycorrhizal associations. In: Azcon-Aguilar C, Barea, JM (eds). *Proceedings of the fourth European Symposium on Mycorrhizas. Mycorrhizas in integrated systems from genes to plant development*. pp. 279-283.
- Flick, C.E., Evans, D.A., Sharp, W.R., 1983: Organogenesis. In: *Handbook of Plant Cell Culture. Vol. 1-Techniques for Propagation and Breeding*. Ed. D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato, Y. Yamada. McMillan Publishing Co. New York. pp.13-81.
- Fontana, A., Centrella, E., 1967: Ectomycorrhizae produced by hypogeous fungi. Ectomicorrize prodotte da funghi ipogei. *Allionia* **13**: 149-176.
- Fortin, J.A., Piché, Y.; Lalonde, M., 1980: Technique for observation of early morphological changes during ectomycorrhiza formation. *Canad. J. Bot.* **68**, 361-365.

- Fortin, J.A., Piché, Y., Godbout, C., 1983: Methods for synthesising ectomycorrhizas and their effect on mycorrhizal development. *Plant and Soil*. **71**: 275-284.
- Frank, A. B., 1887: Ueber neue Mykorrhiza Formen. *Ber. dt. bot. Ges.* **5**: 395-409. In : Barroso, 1988.
- Frankenberger, W.T.Jr.; Poth, M., 1987: Biosynthesis of indole-3-acetic acid by the pine ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2908-2913.
- Gay, G., 1986: Effect of glucose on indole-3-acetic acid production by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma hiemale* in pure culture. *Physiol. Veg.* **24**: 185-192.
- Gay, G.; L. Normand, R. Mermeisse, B. Sotta and J. C. Debaud, 1994: Auxin overproducer mutants of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi have increased mycorrhizal activity. *New Phytol.* **128**, 645-657.
- Grellier, B. Letouzé, R. and Strullu, D. G., 1984: Micropropagation of birch and mycorrhizal formation *in vitro*. *New Phytol.* **94**: 591-599.
- Grente, J.; Vrot, F., 1984: Recherche d'un moyen de lutte biologique contre la maladie de l'encre par utilisation de la symbiose mycorrhizienne. *Comm. Cong. Int. sobre el castaño*. Lourizán. Dep. Inv. Florest. Lourizán. Pontevedra. Pp 185-189. In: Nazaré-Pereira, 1987.
- Gresshof, P.M.; Doy, C.H., 1972: Development and differentiation of haploid *Lycopersicum esculentum* (Tomato). *Planta* **17**: 161-170.
- Guehl, J.M., J. Garbaye and A. Wartinger, 1992: The effects of ectomycorrhizal status on plant-water relations and sensitivity of leaf gas exchange to soil drought in Douglas Fir. In: *Mycorrhizas in Ecosystems*. Eds. D. J. Read, D.H. Lewis, A.H. Fitter and I. J. Alexander, pp. 323-332. C.A.B. International.
- Harley, J.L., 1969: *The Biology of Mycorrhiza* (2nd Edition). Leonard Hill Books, London. In : Barroso, 1988.
- Harley, J.L., 1986: Mycorrhizal studies: past and future. In: *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*. Ed. V. Gianinazzi-Pearson and S. Gianinazzi, pp. 25-33. INRA, Paris.
- Harley, J.L. and Smith, S.E., 1983: *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press.
- Hartig, T., 1840: *Vollständige Naturgeschichte der forstlichen*

- Culturpflanzen Deutschlands. A Förstner'sch Verlagsbuchhandlung, Berlin. In: Barroso, 1988.
- Hatch, A.B., 1937: The physical basis of mycotrophy in *Pinus*. *Black Rock Forest Bull.*, **6**: 1-168. In: Barroso, 1988.
- Hayman, D.S., 1983: The physiology of vesicular-arbuscular endomycorrhizal symbiosis. *Can. J. Bot.* **61**: 944-963.
- Holloway, P.J. and Arundel, P.H. 1988: High-resolution two-dimension electrophoresis of plant proteins. *Anal. Biochem.* **172**: 8-15.
- Hu, Hung Tao, 1977: The influences of differences in soil moisture on survival, growth and histological changes in ectomycorrhizal red pine seedlings. *Bull. exp. Nat. Taiwan Univ.* **120**: 13-37. In : Harley and Smith, 1983.
- Ingestad, T., Arveby, A.S., Kärh, M., 1986: The influence of ectomycorrhiza on nitrogen nutrition and growth of *Pinus sylvestris* seedlings. *Physiol. Plant.* **68**: 575-582.
- Ingleby, K.; Mason, P.A.; Last, F.T. and Fleming, L.V., 1990: Identification of ectomycorrhizas. Institute of Terrestrial Ecology, publication n° 5.
- Jacquot, C., 1947: Effect inhibiteur des tannins sur le développement des cultures *in vitro* du cambium de certains arbres fruitiers. *C.R. Acad. Sci. Ser.D.* **226**: 434-436.
- Jones, M.D., Durall, D.M., Tinker, P.B., 1990: Phosphorus relationships and production of extramatrical hyphae by two types of willow ectomycorrhizas at different soil phosphorus levels. *New Phytol.*, **115**: 259-267. In: Nazaré-Pereira, 1987.
- Kalmar, Z., 1950: Kalapos gombáink (Hymenomycetes) mykorrhiza-kapcsolatai Magyar Agrar. Egyetem. *Erd. Tud. Int. Evkón* **1**: 277-291. In: Nazaré-Pereira, 1987.
- Kalmar, Z., 1954: A kalaposgombák mykorrhiza-kapcsolatainak gyakorlatai Jelenősege. *Erd. Tud. Int. Evkón* **2**: 157-187. In: Nazaré-Pereira, 1987.
- Kamienski, F., 1882: Les organes végétatives du *Monotropa hypopitys* L. *Mem. Soc. nat. Sci. nat. Math. Cherbourg* **24**: 5-40. In : Harley and Smith, 1983.
- Kraft, M.M., 1956: Sur la repartition d'*Amanita caesarea* (Fr. ex. Scop.) *Quelet. Bull. Soc. Bot. Suisse.* **66**, 39-91. In: Nazaré-Pereira, 1987.
- Lapeyrie, F.F., Bruchet, G., 1985: Some factors influencing viability of ectomycorrhizal fungal inoculum. *New Phytol.* **100**: 585-593.

- Lapeyrie, F.F., Chilvers, G.A., Douglass, P.A., 1984: Formation of metachromatic granules following phosphate uptake by mycelial hyphae of an ectomycorrhizal fungus. *New Phytol.* **98**: 345-360.
- Lewis, D.H., 1973: Concepts in fungal nutrition and the origin of biotrophy. *Biol. Rev.* **48**: 261-278. *In*: Harley e Smith, 1983.
- Lewis, D.H., 1975: Comparative aspects of the carbon nutrition of mycorrhizas. *In: Endomycorrhizas* (Eds. F.E. Sanders, B. Mosse and P.B. Tinker), pp. 119-148. Academic Press, London and New York. *In*: Harley e Smith, 1983.
- Lewis, D.H., 1986: Inter-relations between carbon nutrition and morphogenesis in mycorrhizas. *In: Mycorrhizae: Physiology and Genetics*: pp. 85. 1001st European Symposium of Mycorrhizae, Dijon.
- Machler, F.; Nösberger, J., 1980: Regulation of ribulose bisphosphate carboxylase activity in intact wheat leaves by high CO<sub>2</sub> and temperature. *J. Exp. Bot.* **31**: 1485-1491.
- Malajczuk, N., Molina, R., Trappe, J.M., 1984: Ectomycorrhizal Formation in *Eucalyptus*. II. The Ultrastructure of Compatible and Incompatible Mycorrhizal Fungi and Associated Roots. *New Phytol.* **96**: 43-53.
- Malajczuk, N., Lapeyrie, F., Garbaye, J., 1990: Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* on roots of *Eucalyptus urophylla* *in vitro*. *New Phytol.*: **114**: 627-631.
- Mayer, A.M., 1988: Plant-fungal interactions: a plant physiologist viewpoint. *Phytochem.* Review article number **41**: 311-317.
- Marchand, A., 1971: Champignons du Nord et du Midi. Vol I. Les meilleurs comestibles et les principaux vénéneux. *Soc. Myc. Pyrénées Méditerranéennes*, Perpignan. 282p. *In*: Nazaré-Pereira, 1987.
- Marchand, A., 1973: Champignons du Nord et du Midi. Vol II. Les meilleurs comestibles. *Soc. Myc. Pyrénées Méditerranéennes*, Perpignan. 273p. *In*: Nazaré-Pereira, 1987.
- Martin, F., Marchal, J.-P., Timinska, A., Canet, D., 1985: The metabolism and physical state of polyphosphate in ectomycorrhizal fungi. A <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance study. *New Phytol.* **101**: 275-290.
- Martin, F.; Chalot, M.; Brun, A.; Lorillou, S.; Botton, B.; Dell, B., 1992: Spatial distribution of nitrogen assimilation pathways in ectomycorrhizas. *In: Mycorrhizas in Ecosystems*. Ed. D. J. Read, D. H. Lewis, A. H. Fitter and I. J. Alexander. C.A.B.

- International. pp. 311-315.
- Martins A., 1992: Micorrização *in vitro* de plantas micropopagadas de *Castanea sativa* Mill.. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Secreção Vegetal e Produtos Naturais Renováveis. Faculdade de Ciências de Lisboa.
- Martins A, Barroso J, Pais MS (1996) Effect of ectomycorrhizal fungi on survival and growth of micropropagated plants and seedlings of *Castanea sativa* Mill. *Mycorrhiza* **6**: 265-270.
- Marx, D. H., 1969: The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathol.* **59**: 153-163.
- Marx, D. H., 1970: The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. V. Resistance of mycorrhizae to infection by vegetative mycelium of *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathol.* **60**: 1472-1473.
- Marx, D. H., 1972: Growth of ectomycorrhizal and nonmycorrhizal shortleaf pine seedlings with *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathol.* **63**: 18-23.
- Marx, D. H., 1973: Mycorrhizae and feeder root disease. In: *Ectomycorrhizae* (Eds. G.C. Marks and T.T. Kozlowski), pp. 351-382. Academic Press.
- Marx, D. H., 1974: Ectomycorrhizae as biological deterrants to pathogenic root infections. *Ann. Rev. Phytopatol.* **10**, 429-454. In: Nazaré-Pereira, 1987.
- Marx, D.H., Davey, C.B., 1969a: The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. III. Resistance of aseptically formed mycorrhizae to infection by *Phytophthora cinnamomi*: *Phytopathol.* **59**: 549-565.
- Marx, D.H., Davey, C.B., 1969b: The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. IV. Resistance of naturally occurring mycorrhizae to infection by *Phytophthora cinnamomi*: *Phytopathol.* **59**: 559-565.
- Marx, D. H. and Cordell, C. E., 1989: Use of ectomycorrhizas to improve forestation practices. In: *Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth*. Eds. J. M: Whipps and R. D. Lumsden. Cambridge.
- Masui, K., 1927: A study of ectotrophic mycorrhizas of woody plants.

- Col. Sci. Kioto Imp. Univ. Mem (Serv. B)* **3**, 149-279. In: Nazaré-Pereira, 1987.
- Meireles, M. T.; 1997: Identificação e isolamento *in vitro* dos macromicetas de um castinçal de Bragança. Relatório final de Estágio de Gestão de Recursos Florestais. Escola Superior Agrária de Bragança.
- Mejstřík, V.K., 1975: The effect of mycorrhizal infection of *Pinus sylvestris* and *Picea abies* by two *Boletus* species on the accumulation of phosphorus, *New Phytol* **74**: 455-459.
- Menezes, A. C.; 1990: "Inventário de cogumelos em soutos e castinçais de Trás-os-Montes. Relatório final de Estágio. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real.
- Meyer, F.H., 1987: Extreme site conditions and ectomycorrhizae (especially *Cenococcum geophyllum*). *Mycorrhiza and Plant Stress. Mykorrhiza und bei Pflanzen. Angew. Bot.* pp.39-46.
- Molina, R., Trappe, J.M., 1982: Patterns of ectomycorrhizal host specificity and potencial among Pacific Northwest conifers and fungi. *Forest Sci.* **28**: 423-458.
- Mollenhauer, H. H., 1964: Plastic embedding for use in electron microscopy. *Stain Technol.* **39**: 111-114.
- Maia, M.L.R.M., 1988: A Silvicultura do Castanheiro na Região de Trás-os-Montes: Resultados Preliminares. Estação Florestal Nacional. INIA.
- Mullins, K.V., 1987: Micropropagation of chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Acta Hort.* **212**: 525-530.
- Nazaré-Pereira, A., 1987: Micorrizas de Soutos e Castinçais. Encontro Sobre Soutos e Castinçais. Castelo de Vide. Portugal.
- Nylund, J.E., 1980: Symplastic continuity during Hartig net formation in Norway Spruce ectomycorrhizae. *New Phytol.* **86**: 373-378.
- Oliveira, A.M.M.C.; Alves, A.A.M., 1987: Quadro Ecológico-Cultural da Silvicultura do Castanheiro. Encontro sobre Soutos e Castinçais. Castelo de Vide. Portugal.
- Osmond, C.B., 1981: Photorespiration and photoinhibition: Some implications for the energetics of photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta.* **639**: 77-98.
- Ozerol, N.H. and Titus, J.F., 1965: The determination of total chlorophyll in methanol extracts. *Trans Illinois State Academy of Science.* Vol. **58**, (2).
- Pacioni, G., Zaccagno, G., 1976: Le aree tartufigole d'Abruzzo. *Mic.*

- Ital.* **2**, 19-26. In: Nazaré-Pereira, 1987.
- Peyronel, B., 1922a: Altri nuovi casi di rapporti micorrizici tra fanerogame e basidiomiceti. *Bull. Soc. Bot. Ital.* **4**, 50-52. In: Nazaré-Pereira, 1987.
- Peyronel, B., 1922b: Nuovi casi di rapporti micorrizici tra fanerogame e arboree. *Bull. Soc. Bot. Ital.* **4**, 50-52. In: Nazaré-Pereira, 1987.
- Perrin, R.; Garbaye, J., 1983: Influence of ectomycorrhizae on infectivity of *Pythium*-infested soils and substrates: *Plant and Soil* **71**: 345-351.
- Perrin, R., 1985: L'aptitude des mycorhizes à protéger les plantes contre les maladies: panacée ou chimère? *Ann.Sci.For.* **42** (4): 453-470.
- Piché, Y., Peterson, R.L., 1988: Mycorrhiza initiation: an exemple of plant microbial interactions. In: Forest and Crop Biotechnology. Progress and Prospects. Fredrick A. Valentine Ed. Springer-Verlag pp.
- Piché, Y., Fortin, J.A, Peterson, R.L., Posluszny, U., 1982: Ontogeny of dichotomizing apices in mycorrhizal short roots of *Pinus strobus*. *Can.J. Bot.* **60**:1523-1528.
- Plassard, C.; Mousain, D.; Salsac, L., 1984: Mesure *in vitro* de l'activité nitrate réductase dans les thalles de *hebeloma cylindrosporum*, champignon basidiomycète. *Physiologie Végétale* **22**, 67-74.
- Poissonier, M., 1986: Mycorrhization *in vitro* de clones d'eucalyptus - note de laboratoire. AFOCEL.
- Rancillac, M., 1983: La mycorrhization *in vitro*: Influence de la morphologie et des structures anatomiques de l'appareil racinaire sur l'établissement des ectomycorrhizes. *Bull. Soc. bot. Fr.*, Actual.bot. **130** (2): 47-52.
- Read, D.J., 1983: The Biology of mycorrhizae in the *Ericales*. *Can. J. Bot.* **61**, 985-1004.
- Reid, C.P.P.; Kidd, F.A.; Ekwebelam, S.A., 1983: Nitrogen nutrition, photosynthesis and carbon allocation in ectomycorrhizal pine. *Plant Soil.* **71**: 415-432.
- Reissek, S., 1847: Endophyten der Pflanzenzelle. *Naturw. Abh.* (Ed. W. Haidinger), **1**: 31. In: Harley and Smith, 1983.
- Rodriguez, R., 1982: *In vitro* propagation of *Castanea sativa* Mill. through meristem.tip culture. *Hortscience* **17**: 888-889.
- Rolin, D., Le Tacon, F., Larher, F., 1984: Characterization of the different forms of phosphorus in the mycelium of the ectomycorrhizal fungus, *Hebeloma cylindrosporum*, cultivated

- in pure culture. *New Phytol.* **98**: 335-343.
- Ronald, P., Söderhäll, K., 1985: Phenylalanine ammonia lyase and the peroxidase activity in mycorrhizal and nonmycorrhizal short roots of scots pine, *Pinus sylvestris* L., *New Phytol.* **101**: 487-494.
- Rupp, A.L., Mudge, K.W., 1985: Etephon and auxin induce mycorrhiza-like changes in the morphology of root organ cultures of Mugo pine. *Physiol. Plant.* **64**: 316-322.
- San José, M.C., Vieitez, A.M., Vieitez, E., 1984: *In Vitro* plantlet regeneration from adventitious buds of chestnut. *J.Hort. Sci.* **59**: 359-365.
- Scheromm, P., Plassard, C., Salsac, L., 1990a: Nitrate nutrition of maritime pine (*Pinus pinaster* Soland in Ait.) ectomycorrhizal with *Hebeloma cylindrosporum* Romagn. *New Phytol.* **114**: 93-98.
- Scheromm, P., Plassard, C., Salsac, L., 1990b: Regulation of nitrate reductase in the ectomycorrhizal basidiomycete, *Hebeloma cylindrosporum* Romagn., cultured on nitrate or ammonium. *New Phytol.* **114**: 441-447.
- Slankis, V., 1948: Einfluss von exudaten von *Boletus variegatus* auf die dichotomische Verzweigung isolierte Kiefernwurzeln. *Physiologia Plant.* **1**: 390-400. In : Harley and Smith, 1983.
- Slankis, V., 1949: Wirkung von  $\beta$ -Indolylessigsäure auf die dichotomische verzweigung isolierter wurzeln von *Pinus sylvestris* L. *Svensk bot. Tidsk.* **43**: 603-607. In : Harley and Smith, 1983.
- Slankis, V., 1950: Effect of  $\alpha$ -naphthalene acetic acid on dichotomous branching of isolated roots of *Pinus sylvestris*. *Pl. Physiol.*, **3**: 40-44. In : Harley and Smith, 1983.
- Slankis, V., 1951: Über den Einfluss von  $\beta$ -Indolylessigsäure und anderen wuchstoffen auf das wachstum von Kiefernwurzeln. *Symb. Bot. Upsaliens.* **11**: 1-63. In : Harley and Smith, 1983.
- Slankis, V., 1958: The role of auxin acid and other exudates in mycorrhizal symbiosis of forest trees. In: *Physiology of Forest Trees*. (Ed. K.V. Thimmann). pp. 427-443. Ronald Press. In : Harley and Smith, 1983.
- Smith, F.A., 1972: A comparison of the uptake of nitrate, chloride, and phosphate by excised beech mycorrhizas. *New Phytol.* **71**: 875-878.
- Smith S.E. and Read D.J. (1997): Mycorrhizal symbiosis. Academic Press. pp 605.

- Söderstrom, B.; Read, D. J., 1987: Respiratory activity of intact and excised ectomycorrhizal mycelial systems growing in unsterile conditions. *Soil Biology and Biochemistry*. **19**: 231-236.
- Söderstrom, B.; Finlay, R. D. ; Read, D. J., 1988: The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. IV. Qualitative analysis of carbohydrate contents of mycelium interconnecting host plants. *New Phytol.* **109**: 163-166.
- Söderstrom, B., 1992: The Ecological Potential of the Ectomycorrhizal Mycelium. *In: Mycorrhizas in Ecosystems*. Ed. D. J. Read, D. H. Lewis, A. H. Fitter and I. J. Alexander. C.A.B. International. pp.77-83.
- Strullu, D.G., Grellier, B., Marciniak, D., Letouzé, R., 1986: Micropropagation of chestnut and conditions of mycorrhizal synthesis *in vitro*. *New Phytol.* **102**: 95-101.
- Teixeira, A.R.N., Ricardo, C.P.Pinto, 1983: Fotossíntese. Didáctica Editora. 343 pp.
- Trappe, J.M., 1962: *Cenococcum graniforme* its distribution ecology, mycorrhiza formation, and inherent variation. Ph.D. Diss., Univ. Washington, Seattle, 148p.
- Ulbrich, E., 1936: Ergebnisse neuerer Forschungen über die Mykorrhiza. *Sitzsber. Ges. Naturf. Freunde Berlin*. 1936: 260-274. *In: Nazaré-Pereira*, 1987.
- Unamuno, L.M., 1941: Enumeración y distribución geografica de los Ascomicetos de la Península Ibérica y de las Islas Baleares. *Mem. Real Acad. Cienc. Exact. Fis. y Nat.* Madrid. 403p. *In: Nazaré-Pereira*, 1987.
- Valjalo, J., 1979: Contribution à l'étude de l'association ectomycorrhizienne chez le châtaignier (*Castanea sativa* Miller). Thèse à l'Université de Bordeaux II. 315pp. *In: Nazaré-Pereira*, 1987.
- Valjalo, J.; Delmas, J., 1982: La mycorhization du châtaignier. *Compt. Rend. Acad. Scéances Agric. Française*. **68**: 1147-1152.
- Väre, H., 1990: Aluminium polyphosphate in the ectomycorrhizal fungus *Suillus variegatus* (Fr.) O. Kunze as revealed by energy dispersive spectrometry. *New Phytol.*, **116**: 663-668.
- Vieitez; A.M., Vieitez., E., 1980: Plantlet formation from embrionic tissue of chestnut grown *in vitro*. *Physiol. Plant.*. **50**: 127-130.
- Vieitez; A.M., Vieitez., M.L., 1980: Culture of chestnut shoots from buds *in vitro*. *J. Hort.Sci.*, **55**: 83-84.

- Vieitez; A.M., Vieitez., M.L., 1983: *Castanea sativa* plantlets proliferation from axillary buds cultivated *in vitro*. *Sci. Hort.* **18**: 343-351.
- Vieitez; A.M., Ballester, A.; Vieitez., M.L., 1975: Conyferyl alcohol from of *Castanea sativa* cultured *in vitro*. *Experientia*. **31**. 1163.
- Vieitez; A.M., Gonzalez, M.L., Vieitez., M.L., 1978a: *In vitro* culture of cotyledon tissue of *Castanea sativa* Mill.. *Sci. Hort.* **8**: 243-247.
- Vieitez; A.M., Gonzalez, M.L., Vieitez., M.L., 1978b: Root formation on cotyledon tissue of chestnut *in vitro*. *Inaugural Meeting FESPP*, Edinburgh (Abstr.), pp. 552-553.
- Vieitez; A.M., Vieitez., M.L., Ballester, A., 1981: *In vitro* chestnut regeneration: anatomical and chemical changes during the rooting process. *Proc. Coll. Int. Cult. In Vitro Essences For.* IUFRO. Fontainebleau. France, AFOCEL, pp. 148-152.
- Vieitez; A.M., Vieitez., M.L., Vieitez., E., 1986: Chestnut (*Castanea* spp.), in: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Bajaj, YPS, Ed., Springer Verlag, Berlin, Vol. 1 -Trees- 393-414.
- Vieitez; A.M., Ballester, A., Vieitez., M.L., Vieitez., E., 1983: *In vitro* plantlet regeneration of mature chestnut.. *J. Hort. Sci.*, **58**: 457-463.
- Vrot, F., Grente, J., 1985: Recherche d'un moyen de lutte biologique la maladie de l'encre du châtaignier par utilisation de la symbiose mycorhizienne. *Agronomie*, **5** (6): 558-559.
- Vrot, F., Grente, J.; Chevalier, G., 1976: Association mycorhizienne avec le châtaignier de certains champignons antagonistes *in vitro* du *Phytophthora cinnamomi*. *Ann. Phytopathol.*, **11**, 130-131.
- Warmke, H.E., Sheu-Ling Janet Lee, 1976: Improved Staining Procedures for semithin Epoxy Sections of Plant Tissues. *Stain Technology.*, **51** (3): 179-185.
- Wedding, R.T.; Harley, J.L., 1976: Fungal polyol metabolites in the control of the carbohydrate metabolism of mycorrhizal roots of beech. *New Phytol.*, **77**, 675-688.
- Wullschleger, S.D., Reid, C.P.P., 1990: Implication of ectomycorrhizal fungi in the cytokinin relations of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *New Phytol.*, **116**: 681-688.
- Zak, B., 1964: Role of mycorrhizae in root disease. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **2**: 377-392.



## Títulos publicados:

**A agricultura nos distritos de Bragança e Vila Real**

Francisco José Terroso Cepeda – 1985

**Política económica francesa**

Francisco José Terroso Cepeda – 1985

**A educação e o ensino no 1º quartel do século XX**

José Rodrigues Monteiro e Maria Helena Lopes Fernandes – 1985

**Trás-os-Montes nos finais do século XVIII:****alguns aspectos económico-sociais**

José Manuel Amado Mendes – 1985

**O pensamento económico de Lord Keynes**

Francisco José Terroso Cepeda – 1986

**O conceito de educação na obra do Abade de Baçal**

José Rodrigues Monteiro – 1986

**Temas diversos – economia e desenvolvimento regional**

Joaquim Lima Pereira – 1987

**Estudo de melhoramento do prado de aveia**

Tjarda de Koe – 1988

**Flora e vegetação da bacia superior do rio Sabor  
no Parque Natural de Montesinho**

Tjarda de Koe – 1988

**Estudo do apuramento e enriquecimento  
de um pré-concentrado de estanho tungsténio**

Arnaldo Manuel da Silva Lopes dos Santos – 1988

**Sondas de neutrões e de raios Gama**

Tomás d'Aquino Freitas Rosa de Figueiredo – 1988

**A descontinuidade entre a escrita e a oralidade na aprendizagem**

Raul Iturra – 1989

**Absorção química em borbulhadores gás-líquido**

João Alberto Sobrinho Teixeira – 1990

**Financiamento do ensino superior no Brasil  
– Reflexões sobre fontes alternativas de recursos**

Victor Meyer Jr. – 1991

**Liberalidade régia em Portugal nos finais da idade média**

Vitor Fernando Silva Simões Alves – 1991

---

**Educação e loucura**

José Manuel Rodrigues Alves – 1991

**Emigrantes regressados e desenvolvimento  
no Nordeste Interior Português**

Francisco José Terroso Cepeda – 1991

**Dispersão em escoamento gás-líquido**

João Alberto Sobrinho Teixeira – 1991

**O regime térmico de um luvissole na Quinta de Santa Apolónia**

Tomás d'Aquino F. R. de Figueiredo - 1993

**Conferências em nutrição animal**

Carlos Alberto Sequeira - 1993

**Bref aperçu de l'histoire de France**

– des origines à la fin du 1er empire

João Sérgio de Pina Carvalho Sousa – 1994

**Preparação, realização e análise / avaliação**

**do ensino em Educação Física no Primeiro Ciclo do Ensino Básico**

João do Nascimento Quina – 1994

**A pragmática narrativa e o confronto de estéticas**

**em *Contos de Eça de Queirós***

Henriqueta Maria de Almeida Gonçalves – 1994

**“Jesus” de Miguel Torga: análise e proposta didáctica**

Maria da Assunção Fernandes Morais Monteiro – 1994

**Caracterização e classificação etnológica dos ovinos churros  
portugueses**

Alfredo Jorge Costa Teixeira – 1994

**Hidrogeologia de dois importantes aquíferos (Cova de Lua, Sabariz) do  
maciço polimetamórfico de Bragança**

Luís Filipe Pires Fernandes – 1997