

Universidade do Minho  
Escola de Ciências, Departamento de Biologia

*Paula Cristina dos Santos Baptista*

***Macrofungos associados à cultura de castanheiro: aspectos da sua biodiversidade e da interacção de *Pisolithus tinctorius* e *Hypholoma fasciculare* com raízes de *Castanea sativa* Mill.***

Tese de Doutoramento  
Ciências

Trabalho efectuado sob a orientação do(a)  
Professora Doutora Maria Teresa Correia Guedes Lino Neto  
Professor Doutor Rui Manuel Peixoto Tavares

Abril de 2007

## **Declaração**

É autorizada a reprodução integral desta tese apenas para efeitos de investigação.

---

(Paula Cristina dos Santos Baptista)

O trabalho que se apresenta teve apoios financeiros de:

Projecto AGRO, nº 689 *“Demonstração do papel dos macrofungos na vertente agronómica, económica e ambiental no Nordeste Transmontano. Aplicação à produção de plantas de castanheiro, pinheiro e carvalho”*

Projecto FCT – POCTI/BSE/38059/2001 *“Study of the mechanisms regulating the interactions between ectomycorrhizal fungi and roots of Castanea sativa Mill. (European chestnut)”*

A autora beneficiou de dispensa de serviço docente ao abrigo do:

Programa PRODEP III – medida 5, Acção 5.3 – Formação Avançada de Docentes do Ensino Superior.



*Ao Zé*

*Ao Gonçalo*



## AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Teresa Lino-Neto, quero manifestar o meu agradecimento por ter aceite orientar este trabalho, por todo o apoio que me dispensou ao longo da sua realização, pela permanente disponibilidade nas estadias que efectuei em Braga, pela confiança que em mim depositou e pelo enorme empenhamento que demonstrou no desenvolvimento do trabalho, pautado pela sua presença em algumas “noitadas” passadas no laboratório. Agradeço ainda o seu incentivo e a infundável compreensão, carinho e amizade demonstrado nos momentos em que mais precisei.

Ao Professor Doutor Rui Tavares, quero expressar a minha admiração pelas suas qualidades científicas e agradecer a oportunidade de fazer parte de um grupo de investigação de elevada qualidade, brindado com alguns prémios internacionais. Gostaria também de mostrar o meu apreço pela simpatia com que me recebeu e pela ajuda sempre disponibilizada.

Ao Departamento de Biologia da Universidade do Minho as condições disponibilizadas para a concretização desta tese.

À Professora Doutora Anabela Martins, principal responsável pelo meu envolvimento no mundo das micorrizas, agradeço a sua amizade e apoio sempre demonstrado. Manifesto ainda a minha admiração pela sua perseverança e pelo seu esforço em proporcionar condições materiais e humanas para o desenvolvimento dos trabalhos no laboratório de Biologia da Escola Superior Agrária de Bragança.

À Professora Doutora Maria Salomé Pais Telles Antunes e à Doutora Mónica Sebastiana (ICAT – Lisboa) agradeço a cedência da metodologia de estabelecimento de culturas hidropónicas de castanheiro, bem como as sondas de DNA de hidrofobinas de *Pisolithus tinctorius* (que apesar de não terem sido utilizadas no presente trabalho, serão imprescindíveis no prosseguimento do mesmo).

Aos companheiros de laboratório Joana, Cátia, André, Manú, Óscar, Paulo, Conde, Natacha, Herlânder, Marta e Luís, um obrigada especial pela simpatia e carinho com que me receberam, por todos os momentos de laboratório, pela partilha das dúvidas, do conhecimento e pela forma prestável com que sempre me ajudaram ao longo destes anos.

Um agradecimento especial à Alice, pelo seu companheirismo e boa disposição que tornavam mais agradáveis as noites no laboratório, pelos conselhos práticos que jamais esquecerei, constante disponibilidade e acima de tudo pela sua amizade.

A todos os docentes e funcionários do Departamento de Biologia da Escola de Ciências da Universidade do Minho, pelo bom ambiente, pela simpatia com que me receberam e pela ajuda sempre disponibilizada.

Agradeço ao Instituto Politécnico de Bragança e Escola Superior Agrária pela minha inclusão no Programa PRODEP, que possibilitou a dispensa de serviço docente e pelas facilidades concedidas para a realização do mesmo.

Aos meus colegas de Departamento de Biologia, em especial à Sónia e à Ana, agradeço toda a compreensão, companheirismo e colaboração sempre demonstrada.

À Sara Branco, responsável pelos meus primeiros passos na macromicologia, agradeço o seu apoio, ajuda na identificação de algumas espécies, a partilha de dúvidas e de conhecimentos.

Um imenso obrigado à Amélia Santos e Isabel Afonso por todo o apoio e pronta colaboração face às minhas solicitações, compreensão, amizade e boa disposição que tornavam mais agradáveis as horas passadas no laboratório.

Ao Rui, Mauro e Mariana, pela permanente boa disposição nas saídas de campo, pela amizade partilhada e pela colaboração.

À Escola Superior Agrária de Bragança, na pessoa do Engenheiro Jorge Araújo e da Professora Doutora Margarida Arrobas agradeço, respectivamente, a cedência dos dados climáticos e análise dos solos.

A todos os meus amigos que estiveram presentes.

A toda a minha família, em especial à minha mãe, pai e mana, pelo apoio e amor incondicional, incentivo e palavras de conforto nos momentos em que mais precisei, por tudo aquilo que são e significam para mim...

Um agradecimento muito especial ao Zé, pelo seu apoio, incentivo e amor, que no dia-a-dia sempre demonstrou, pela partilha dos bons e maus momentos e pela compreensão das minhas ausências. Obrigada por existires! Obrigada por teres sido pai e mãe, nestes últimos tempos!

Ao Gonçalo, agradeço o seu enorme sorriso, que me faz esquecer os pequenos contratempos e me dá forças para continuar. Apesar de pequeno conseguia compreender que a mãe nem sempre podia brincar, para que pudesse escrever o “livro”. Para ti, meu doce “príncipe”, que incessantemente perguntavas quando terminava, quero dizer-te que já está! Contigo a meu lado tudo foi mais fácil!

## **Macrofungos associados à cultura de castanheiro: aspectos da sua biodiversidade e da interacção de *Pisolithus tinctorius* e *Hypholoma fasciculare* com raízes de *Castanea sativa* Mill.**

### **RESUMO**

No Nordeste transmontano, a cultura do castanheiro (*Castanea sativa* Mill.) tem grande importância, económica, social, cultural e paisagística. A dinâmica populacional de fungos associados a uma plantação de castanheiros localizada em Bragança foi avaliada mediante a monitorização dos seus corpos de frutificação, os cogumelos. Os resultados evidenciaram uma flora micológica diversificada, tendo sido registadas 73 espécies, pertencentes a 16 famílias e 23 géneros. A frutificação dos cogumelos ocorreu em duas épocas distintas do ano, uma no Outono e outra na Primavera, sendo a primeira aquela onde se observou um maior número de espécies e de carpóforos. A temperatura e precipitação parecem influenciar a diversidade e a abundância das espécies fúngicas existentes no souto. A elevada predominância das espécies micorrízicas, que perfizeram 82% do total registado, sugere que o ecossistema estudado se encontra em equilíbrio e em bom estado de conservação.

O estudo de interacção entre o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch e o fungo saprófita-lenhícola *Hypholoma fasciculare* (Huds.) P. Kumm., ambos com ocorrência no souto estudado, foi realizado pelo método de cultura dupla. A acção antagonista de *H. fasciculare* sobre *P. tinctorius* foi evidenciada pelos mecanismos de “antagonismo à distância”, nos estádios iniciais da interacção, e “interferência de hifas”, nos estádios tardios. A espécie *P. tinctorius* parece responder à acção antagonista pela formação de um micélio mais compacto e provavelmente pela produção de ácido oxálico.

O estudo da interacção entre raízes de plântulas de *C. sativa* e o fungo *P. tinctorius* ou *H. fascicular* foi efectuado num sistema hidropónico. Em ambos os sistemas, durante as primeiras 48 horas de contacto raiz-fungo, foi verificada a indução de resposta de defesa semelhante à observada em interacções planta-patogénio. Nesta resposta foi observada produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS), como peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e anião superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), cujos níveis parecem ser

regulados pela acção coordenada entre as diferentes vias de produção de ROS e a inactivação/activação de enzimas antioxidantes (catalase e superóxido dismutase). A partir das 48 horas após inoculação os mecanismos subjacentes à defesa parecem distinguir-se em função do tipo de interacção, surgindo efeitos deletérios para as plantas inoculadas com *H. fasciculare*, contrariamente ao verificado em plantas inoculadas com o fungo ectomicorrízico. A agressividade exibida por *H. fasciculare* sobre *C. sativa*, poderá estar associada à produção de hidrofobinas produzida pelo fungo, tendo sido identificada e caracterizada a região codificante de uma hidrofobina de classe I.

Este trabalho revela que o solo do souto constitui um meio natural muito complexo onde opera uma grande variedade de interacções entre diferentes organismos. A acção antagonista de *H. fasciculare* sobre *P. tinctorius*, a ser verificada em condições naturais, poderá colocar em risco a sustentabilidade e produtividade da cultura do castanheiro, dado o efeito benéfico da micorrização com *P. tinctorius* no crescimento e nutrição de castanheiros e efeito protector contra patógenos radiculares. Este risco poderá ainda ser mais ampliado pelo facto do fungo *H. fasciculare* exhibir um comportamento agressivo contra plântulas de castanheiro.

**Palavras-chave:** macrofungos, biodiversidade, *Castanea sativa*, *Pisolithus tinctorius*, *Hypholoma fasciculare*, interacção planta-fungo, interacção fungo-fungo, antagonismo.

## **Macrofungi associated to chestnut culture: aspects of their biodiversity and interaction between *Pisolithus tinctorius* and *Hypholoma fasciculare* with *Castanea sativa* Mill. roots**

### **ABSTRACT**

In “Trás-os-Montes” region (Northeast of Portugal), chestnut tree (*Castanea sativa* Mill.) has a great economic, social, cultural and landscape value. The dynamics of fungus population associated to a chestnut orchard located at Bragança was evaluated by sampling the fructification bodies of macrofungi – the mushrooms. The results have shown a diversified mycological flora, being registered 73 species, belonging to 16 families and 23 genera. The macrofungal fructification occurred in two distinct seasons a year, during Autumn and Spring, being the first one the most important in number of species and carpophores. Temperature and precipitation seem to influence the diversity and abundance of macrofungal species. The higher predominance of mycorrhizal species, representing 82% of total macrofungi registered, suggests that the studied ecosystem is in good health.

Interactions studies between the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch and the lignicolous saprotrophs fungus *Hypholoma fasciculare* (Huds.) P. Kumm. (both frequent in the studied orchard) were performed in dual cultures on Norkrans agar medium. The antagonistic action of *H. fasciculare* on *P. tinctorius* resulted from the mechanisms of “antagonism at a distance”, in the initial stages of interaction, and “hyphal interference”, in delayed stages. *P. tinctorius* seems to have a response to the antagonistic action by developing more compact mycelia and probably by the production of oxalic acid.

Interactions studies between *C. sativa* roots and *P. tinctorius* or *H. fasciculare* was evaluated in a hydroponic system. In both interactions systems, during the first 48 hours of contact, an induction of defence response similar to an incompatible plant-pathogen interaction was observed. The production of reactive oxygen species (ROS), as hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), seems to result from a regulated time-dependent stimulation of ROS generating systems and decrease/increased of ROS-scavenging enzyme activities (catalase and superoxide

dismutase). After 48 hours of contact, the mechanisms of defence response seem to be distinguished in both types of interaction. Inoculations with *H. fasciculare* have showed deleterious effects on chestnut plants, contrarily to the inoculation with ectomycorrhizal fungus. The aggressiveness shown by *H. fasciculare* on *C. sativa* could be associated to hydrophobins produced by the fungus, a coding region of which has been identified and characterized as a class I hydrophobin.

This work shows that the soils of *C. sativa* orchards are very complex, where a great variety of interactions between different organisms can operate. The antagonist effect of *H. fasciculare* on *P. tinctorius*, if occurring in natural conditions, could place in risk the sustainability and productivity of chestnut culture, since mycorrhization with *P. tinctorius* confers several advantages to plant (increased nutrient status, growth and resistance to pathogens). This risk could still be extended since *H. fasciculare* have shown an aggressive behaviour against chestnut plants.

**Key-words:** macrofungi, biodiversity, *Castanea sativa*, *Pisolithus tinctorius*, *Hypholoma fasciculare*, plant-fungus interaction, fungus-fungus interaction, antagonism.

## ÍNDICE

Resumo .....	ix
Abstract.....	xi
Lista de abreviaturas .....	xvii

## CAPÍTULO 1

<b>Introdução Geral</b> .....	1
-------------------------------	---

---

## CAPÍTULO 2

<b>Material e Métodos</b> .....	11
2.1 MATERIAL .....	13
2.1.1 Material biológico .....	13
2.1.2 Reagentes e kits .....	13
2.2 MÉTODOS .....	14
2.2.1 Avaliação da diversidade macrofúngica associada a <i>Castanea sativa</i> Mill. ....	14
2.2.1.1 Recolha e identificação dos carpóforos .....	15
2.2.1.2 Conservação dos carpóforos .....	17
2.2.1.3 Tratamento dos resultados .....	17
2.2.2 Cultura e manutenção de <i>Pisolithus tinctorius</i> e <i>Hypholoma fasciculare</i> .....	19
2.2.3 Ensaio de co-cultura <i>Pisolithus tinctorius</i> - <i>Hypholoma fasciculare</i> .....	19
2.2.3.1 Estabelecimento das co-culturas .....	19
2.2.3.2 Parâmetros avaliados nas co-culturas .....	21
2.2.4 Obtenção de plântulas de <i>Castanea sativa</i> em cultura hidropónica .....	21
2.2.5 Inoculação das plântulas de <i>Castanea sativa</i> .....	22
2.2.6 Efeito do extracto proteico de raízes de castanheiro eliciadas com <i>P. tinctorius</i> no crescimento do fungo <i>P. tinctorius</i> .....	23
2.2.7 Avaliação de stresse oxidativo .....	25
2.2.7.1 Quantificação de peróxido de hidrogénio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	25
2.2.7.2 Detecção histológica do anião superóxido (O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> ) .....	25
2.2.7.3 Determinação da actividade de enzimas de stresse oxidativo .....	26
<i>Superóxido dismutase (SOD)</i> .....	26
<i>Catalase (CAT)</i> .....	26
2.2.8 Extração e quantificação de proteínas .....	27
2.2.9 Microscopia electrónica de varrimento .....	27
2.2.10 Técnicas de manipulação de DNA .....	28
2.2.10.1 Purificação de ácidos nucleicos .....	28
<i>Isolamento de DNA genómico de micélio</i> .....	28
<i>Purificação dos fragmentos de DNA amplificados</i> .....	29
2.2.10.2 Quantificação espectrofotométrica de DNA .....	29

2.2.10.3 Amplificação termocíclica de DNA.....	29
<i>Desenho dos iniciadores oligonucleotídicos</i> .....	29
<i>Reacções de amplificação termocíclica</i> .....	30
2.2.10.4 Separação electroforética de DNA.....	31
2.2.10.5 Sequenciação e análise de sequências de DNA .....	31
2.2.11 Tratamento estatístico.....	31

### CAPÍTULO 3

<b>Diversidade macrofúngica associada a <i>Castanea sativa</i></b> .....	<b>33</b>
--	-----------

3.1 INTRODUÇÃO .....	35
3.1.1 Macrofungos.....	35
3.1.1.1 Definição e classificação taxonómica .....	35
3.1.1.2 Nutrição .....	42
3.1.1.3 Ciclo de vida .....	43
3.1.1.4 Factores que afectam a frutificação.....	45
3.1.2 Micromicologia em Portugal e na região de Trás-os-Montes .....	46
3.1.3 Espécies macrofúngicas associadas a soutos e castiçais em Trás-os-Montes.....	48
3.1.4 Importância dos macrofungos .....	50
3.1.5 Objectivos.....	52
3.2 RESULTADOS.....	54
3.2.1 Caracterização dos solos do souto estudado .....	54
3.2.2 Diversidade da comunidade macrofúngica associada a <i>Castanea sativa</i> .....	54
<i>Riqueza de espécies macrofúngicas</i> .....	54
<i>Abundância de espécies macrofúngicas</i> .....	62
3.2.3 Índices de diversidade .....	62
3.2.4 Estimativa da diversidade através de curvas cumulativas de espécies .....	64
3.2.5 Fenologia de frutificação e de abundância de espécies macrofúngicas .....	66
3.2.6 Frequência de ocorrência das espécies macrofúngicas .....	70
3.2.7 Índice de similaridade de <i>Sorensen</i> .....	74
3.2.8 Produção total de macrofungos .....	76
3.2.9 Espécies macrofúngicas ocorrentes fora das parcelas amostradas.....	79
3.2.10 Influência da temperatura e precipitação na riqueza e abundância de espécies macrofúngicas ..	80
3.3 DISCUSSÃO .....	85
<i>Inventariação efectuada no souto estudado</i> .....	85
<i>Diversidade de macrofungos micorrízicos no souto estudado</i> .....	89
<i>Riqueza e abundância de espécies macrofúngicas no souto estudado</i> .....	91
<i>Ocorrência e fenologia de frutificação de espécies macrofúngicas no souto estudado</i> .....	93
<i>Condições climáticas na produção de macrofungos</i> .....	95
<i>Produção de macrofungos no souto estudado</i> .....	97
<i>Exploração do souto na produção de cogumelos comestíveis</i> .....	98

## CAPÍTULO 4

### Estudo da interacção: *Pisolithus tinctorius* – *Hypholoma fasciculare* ..... 101

---

4.1 INTRODUÇÃO .....	103
4.1.1 Tipos de interacção em fungos saprófitas-lenhícolas .....	104
<i>Mecanismos antagonistas desenvolvidos por fungos saprófitas-lenhícolas</i> .....	105
4.1.2 Factores que afectam a interacção entre fungos .....	107
4.1.3 Efeito das interacções fúngicas negativas na comunidade biótica .....	109
4.1.4 Aplicação da interacção: controlo biológico de doenças .....	110
4.1.5 <i>Pisolithus tinctorius</i> e <i>Hypholoma fasciculare</i> : duas espécies fúngicas presentes em soutos ...	112
<i>Pisolithus tinctorius</i> .....	113
<i>Hypholoma fasciculare</i> .....	114
4.1.6 Identificação molecular de fungos .....	116
4.1.7 Objectivos .....	117
4.2 RESULTADOS .....	119
4.2.1 Aspectos morfológicos de <i>Pisolithus tinctorius</i> e <i>Hypholoma fasciculare</i> .....	119
4.2.2 Identificação molecular de <i>H. fasciculare</i> e <i>P. tinctorius</i> .....	121
4.2.3 Efeito da interacção <i>P. tinctorius</i> - <i>H. fasciculare</i> no crescimento micelial.....	127
4.2.4 Caracterização morfológica das co-culturas.....	130
<i>Aspectos macroscópicos</i> .....	130
<i>Aspectos microscópicos</i> .....	133
4.2.5 Detecção de acidificação do meio de interacção .....	133
4.3 DISCUSSÃO .....	137
<i>Identificação das espécies Pisolithus tinctorius e Hypholoma fasciculare</i> .....	137
<i>Alterações de crescimento das espécies interactuantes</i> .....	138
<i>Alterações morfológicas das espécies interactuantes</i> .....	141
<i>Produção de cristais de cálcio como resposta da interacção</i> .....	144

## CAPÍTULO 5

### Estudo das interacções: *Castanea sativa* – *Pisolithus tinctorius*

#### *Castanea sativa* – *Hypholoma fasciculare* ..... 147

---

5.1 INTRODUÇÃO .....	149
5.1.1 Simbiose ectomicorrízica .....	149
5.1.1.1 Desenvolvimento ectomicorrízico .....	150
5.1.1.2 Sinais rizosféricos emitidos durante a pré-colonização .....	152
5.1.1.3 Proteínas envolvidas na adesão e formação da interface simbiótica .....	155
5.1.1.4 Morfogénese da ectomicorriza.....	159
5.1.1.5 Alteração da expressão génica durante o desenvolvimento ectomicorrízico .....	161
5.1.2 Efeito de fungos saprófitas no desenvolvimento ectomicorrízico .....	164
5.1.3 Indução de respostas de defesa na planta .....	165
5.1.3.1 Indução de respostas de defesa na planta por fungos ectomicorrízicos .....	167

5.1.3.2	Indução de respostas de defesa na planta por fungos saprófitas .....	169
5.1.4	Stresse oxidativo .....	170
5.1.5	Objectivos.....	174
5.2	RESULTADOS.....	176
5.2.1	Interacção <i>Castanea sativa</i> – <i>Pisolithus tinctorius</i> .....	178
5.2.1.1	Capacidade de adesão de <i>P. tinctorius</i> a raízes de castanheiro .....	178
5.2.1.2	Produção de espécies reactivas de oxigénio.....	179
	<i>Peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)</i> .....	179
	<i>Anião superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)</i> .....	181
5.2.1.3	Actividade de enzimas de stresse oxidativo .....	183
	<i>Superóxido dismutase (SOD)</i> .....	183
	<i>Catalase</i> .....	185
5.2.1.4	Efeito do extracto proteico de raízes de castanheiro eliciadas com <i>P. tinctorius</i> no crescimento do fungo <i>P. tinctorius</i> .....	186
5.2.2	Interacção <i>Castanea sativa</i> – <i>Hypholoma fasciculare</i> .....	191
5.2.2.1	Capacidade de adesão de <i>H. fasciculare</i> a raízes de castanheiro .....	191
5.2.2.2	Sintomas em plântulas de <i>C. sativa</i> decorrentes da eliciação radicular com <i>H. fasciculare</i> ..	192
5.2.2.3	Envolvimento de hidrofobinas na adesão de <i>H. fasciculare</i> a raízes de <i>C. sativa</i> .....	193
	<i>Desenho dos iniciadores oligonucleotídicos</i> .....	193
	<i>Análise da sequência de hidrofobina de H. fasciculare</i> .....	195
5.2.2.4	Produção de espécies reactivas de oxigénio.....	201
	<i>Peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)</i> .....	201
	<i>Anião superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)</i> .....	203
5.2.2.5	Actividade de enzimas de stresse oxidativo .....	205
	<i>Superóxido dismutase (SOD)</i> .....	205
	<i>Catalase</i> .....	206
5.3	DISCUSSÃO .....	209
5.3.1	Interacção <i>Castanea sativa</i> - <i>Pisolithus tinctorius</i> .....	209
	<i>Envolvimento de espécies reactivas de oxigénio</i> .....	210
	<i>Efeito de extractos de raízes eliciadas no crescimento do fungo micorrízico</i> .....	214
5.3.2	Interacção <i>Castanea sativa</i> – <i>Hypholoma fasciculare</i> .....	218
	<i>Adesão do fungo à raiz de castanheiro</i> .....	218
	<i>Síntese de hidrofobinas por Hypholoma fasciculare</i> .....	220
	<i>Envolvimento de espécies reactivas de oxigénio</i> .....	224

## CAPÍTULO 6

<b>Conclusões e Perspectivas Futuras</b> .....	229
--	-----

<b>ANEXOS</b> .....	237
---------------------	-----

<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	249
---------------------------	-----

## Lista de abreviaturas

A <sub>xxx</sub>	Absorvância a xxx nm
BLAST	<i>Basic Local Alignment Research Tool</i>
BSA	Albumina do soro de bovino
°C	Grau Celsius
CAT	Catalase
C <sub>s</sub>	Índice de similaridade de <i>Sorensen</i>
D	Índice de diversidade de <i>Simpson</i>
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	2'-Desoxinucleósido trifosfatos
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ep	Erro padrão
g	Aceleração gravítica
g	Gramma
h	Hora
H'	Índice de <i>Shannon-Wiener</i>
ha	Hectare
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogénio
Hf-Hf	Co-cultura <i>H. fasciculare</i> - <i>H. fasciculare</i>
HR	Resposta hipersensível
ITS	Região espaçadora transcrita interna (do inglês, <i>Internal Transcribed Spacer</i> )
kb	Quilopares de bases
L	Litro
M	Molar
m	Metro
min.	Minuto
MMN	Meio Melin-Norkrans
mol	Mole
NBT	Nitroazul de Tetrazólio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Anião superóxido
ORF	Grelha de leitura aberta (do inglês, <i>Open Reading Frame</i> )
p/v	Peso por volume
pb	Par de bases
PCR	Amplificação termocíclica de DNA (do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
ps	Peso seco
Pt-Hf	Co-cultura <i>P. tinctorius</i> - <i>H. fasciculare</i>
Pt-Pt	Co-cultura <i>P. tinctorius</i> - <i>P. tinctorius</i>
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossomal
RFLP	Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (do inglês, <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> )

ROS	Espécie reactiva de oxigénio (do inglês, <i>Reactive Oxygen Species</i> )
rpm	Rotações por minuto
<i>rs</i>	Coefficiente de correlação de <i>Spearman</i>
<i>s</i>	Desvio padrão
SOD	Superóxido dismutase
Triton X-100	Éter de polioxietileno
$\epsilon$	Coefficiente de extinção molar
U	Unidade de actividade enzimática
UV-Vis	Ultravioleta-visível
v/v	Volume por volume
V	Volt

### NUCLEÓTIDOS

A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina
I	Desoxinosina
K	T ou G
M	A ou C
R	A ou G
Y	C ou T

### AMINOÁCIDOS

A	(Ala)	Alanina
C	(Cys)	Cisteína
D	(Asp)	Ácido aspártico
E	(Glu)	Ácido glutâmico
F	(Phe)	Fenilalanina
G	(Gly)	Glicina
H	(His)	Histidina
I	(Ile)	Isoleucina
K	(Lys)	Lisina
L	(Leu)	Leucina
M	(Met)	Metionina
N	(Asn)	Asparagina
P	(Pro)	Prolina
Q	(Gln)	Glutamina
R	(Arg)	Arginina
S	(Ser)	Serina
T	(Thr)	Treonina
V	(Val)	Valina
W	(Trp)	Triptofano
Y	(Tyr)	Tirosina

# **CAPÍTULO 1**

## **Introdução Geral**



Em Portugal, o castanheiro (*Castanea sativa* Mill.) encontra-se amplamente distribuído no Norte e Centro do País, principalmente na região interior, sendo produzido em plantações destinadas à produção de castanheiro para madeira - os castinçais – ou em plantações destinadas à produção de fruto - os soutos. No nordeste transmontano, a principal região produtora nacional, a cultura do castanheiro possui elevada importância económica, quer pela qualidade da madeira, quer pelo valor do fruto (a castanha). A madeira constitui a matéria-prima utilizada por excelência quer na categoria das médias e grandes dimensões, construção civil, incluindo elementos estruturais, mobiliário, folheados e carroçarias de luxo; quer nas pequenas dimensões, como por exemplo na cestaria e tanoaria. O fruto (a castanha) constitui o mais conhecido e apreciado produto do castanheiro, sendo o mais importante produto de exportação do sector frutícola em Portugal (Martins, 2004).

A par do reconhecido valor económico desta espécie persiste um rico manancial de tradições orais, artesanais, lúdicas e gastronómicas alusivas à árvore e ao fruto. O “magusto”, bem como a “Festa da Castanha”, são tradições que ainda hoje se mantêm profundamente enraizadas nas populações rurais transmontanas. A castanha é ainda frequentemente utilizada na alimentação da população rural, realçando-se na guarnição de pratos e deliciosos doces. As folhas, cascas e frutos do castanheiro têm sido utilizadas ao longo dos anos pela população rural no tratamento de certas doenças, devido às suas propriedades adstringentes, remineralizantes, sedativas e tónicas (Carvalho, 2005).

A existência de consideráveis quantidades de cogumelos comestíveis, alguns dos quais com elevada valorização comercial nos mercados internacionais, associados aos soutos e castinçais na região transmontana, pode constituir um rendimento complementar ao da produção das castanhas e da madeira (Baptista *et al.*, 2003). Deste modo, a exploração dos soutos e castinçais, tem representado para os agricultores da região transmontana uma fonte de rendimento importante.

A microflora diversificada existente nos solos, na qual intervêm fungos, bactérias, protozoários, algas, nemátodes e vírus, constitui um ecossistema complexo e diversificado. A sua acção, benéfica ou prejudicial para a planta, depende da resposta das interacções que se estabelecem entre microrganismos, raízes e componentes do solo,

que têm lugar sobretudo na rizosfera (Kennedy, 1998; Bowen & Rovira, 1999; Barea *et al.*, 2005; Fageria & Stone, 2006). De facto, os microrganismos desempenham actividades relevantes ao nível do desenvolvimento, nutrição e sanidade das plantas. No caso dos fungos, as principais acções podem ser ao nível (i) da decomposição de resíduos complexos de plantas e animais, (ii) do antagonismo em relação a outros organismos, (iii) da associação parasita ou patogénica, causando doenças nas plantas e (iv) da associação, mutuamente favorável, com as raízes das plantas superiores. Os fungos podem ainda constituir alimento para animais do solo ou insectos e estimular a germinação de sementes (Klein & Paschke, 2004).

A contribuição dos fungos na decomposição de substratos e reciclagem de nutrientes é particularmente importante devido à acidez dos solos, que limita a actividade de outros grupos de microrganismos (como as bactérias celulolíticas), e à vantagem que apresentam na decomposição de detritos vegetais, onde a celulose é o componente estrutural mais importante. Ao contrário das bactérias, que actuam apenas por acção enzimática, os fungos filamentosos associam-na à acção física, traduzida pelo efeito da penetração das hifas nos tecidos vegetais (Deacon, 1997). Como resultado da acção de fungos, um considerável volume de nutrientes minerais vai sendo libertado e translocado. A incorporação de nutrientes nas hifas e a sua capacidade de crescimento e colonização promovem a translocação desses nutrientes para grandes áreas (Klein & Paschke, 2004).

De entre a multiplicidade de interacções que os fungos podem estabelecer com microrganismos do solo interessa destacar a acção exercida sobre outros fungos. Uma das interacções mais importantes diz respeito à acção antagonista que alguns fungos exercem sobre outros. O antagonismo faz sentir-se principalmente por acção dos antibióticos ou enzimas produzidas, competição pelo alimento e parasitismo (Brimner & Boland, 2003).

Além de estabelecerem interacções com outros microrganismos, os fungos são igualmente capazes de interagir com as raízes, na rizosfera, estabelecendo interacções benéficas ou prejudiciais. De facto, os fungos constituem um dos principais agentes patogénicos das plantas, não sendo o castanheiro excepção. As doenças mais frequentes nesta espécie são a doença da “tinta” provocada por dois fungos, *Phytophthora cinnamomi* Rands e *P. cambivora* (Petri) Buis., e o “cancro cortical”, causada pelo fungo *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr.. Estas doenças são as que mais estragou

têm causado em plantações de castanheiro, até porque os meios de protecção utilizados no seu combate têm demonstrado serem ineficazes. Ambas as doenças constituem uma das principais causas do decréscimo da área ocupada por esta cultura, que se tem observado ao longo das últimas décadas em Portugal e, especificamente, na região transmontana.

A associação simbiótica de fungos com as raízes de muitas espécies de plantas superiores -as micorrizas- constitui outra das interações importantes que ocorrem ao nível da rizosfera. Este tipo de associação, de carácter mutualista, caracteriza-se pela existência de fluxos de compostos inorgânicos do fungo para a planta e de compostos orgânicos da planta para o fungo (Smith & Read, 1997). O estabelecimento da micorrização origina modificações fisiológicas na planta hospedeira, resultando numa melhoria para o seu crescimento, desenvolvimento e resistência/tolerância a stresses bióticos e abióticos (Jeffries *et al.*, 2003; Barea *et al.*, 2005), podendo ainda desempenhar uma multiplicidade de acções no sistema solo-planta (Jeffries *et al.*, 2003; Lum & Hirsch, 2003; van der Heijden, 2004; Barea *et al.*, 2005; Fageria & Stone, 2006; Rillig & Mummey, 2006). Especificamente, as micorrizas:

- i) estimulam o enraizamento das plantas hospedeiras, devido à actividade decorrente da produção de hormonas, vitaminas, e de outros compostos pelo fungo;
- ii) aumentam a disponibilidade de nutrientes para a planta, pelo fornecimento de nutrientes minerais e pela intervenção nos ciclos biogeoquímicos dos nutrientes no sistema solo-planta;
- iii) melhoram a estrutura do solo ao contribuírem para a formação de agregados estáveis;
- iv) protegem a planta dos stresses bióticos e abióticos ao aumentar a resistência/tolerância a agentes patogénicos radiculares, à salinidade, secura, deficiência de nutrientes, excesso de metais pesados, entre outros.

As plantas que formam micorrizas incluem a maior parte das angiospérmicas (83% das dicotiledóneas e 79% das monocotiledóneas) e todas as gimnospérmicas (Marschner, 1995). Os fungos envolvidos nesta associação são numerosos e pertencem às classes Ascomycetes, Basidiomycetes, Zigomycetes e Glomeromycetes (Selosse & Le Tacon, 1998; Schüßler *et al.*, 2001), sendo que alguns são simbiontes obrigatórios,

necessitando da associação à planta hospedeira para completarem o seu ciclo de vida (Martin *et al.*, 2001; Barea *et al.*, 2005).

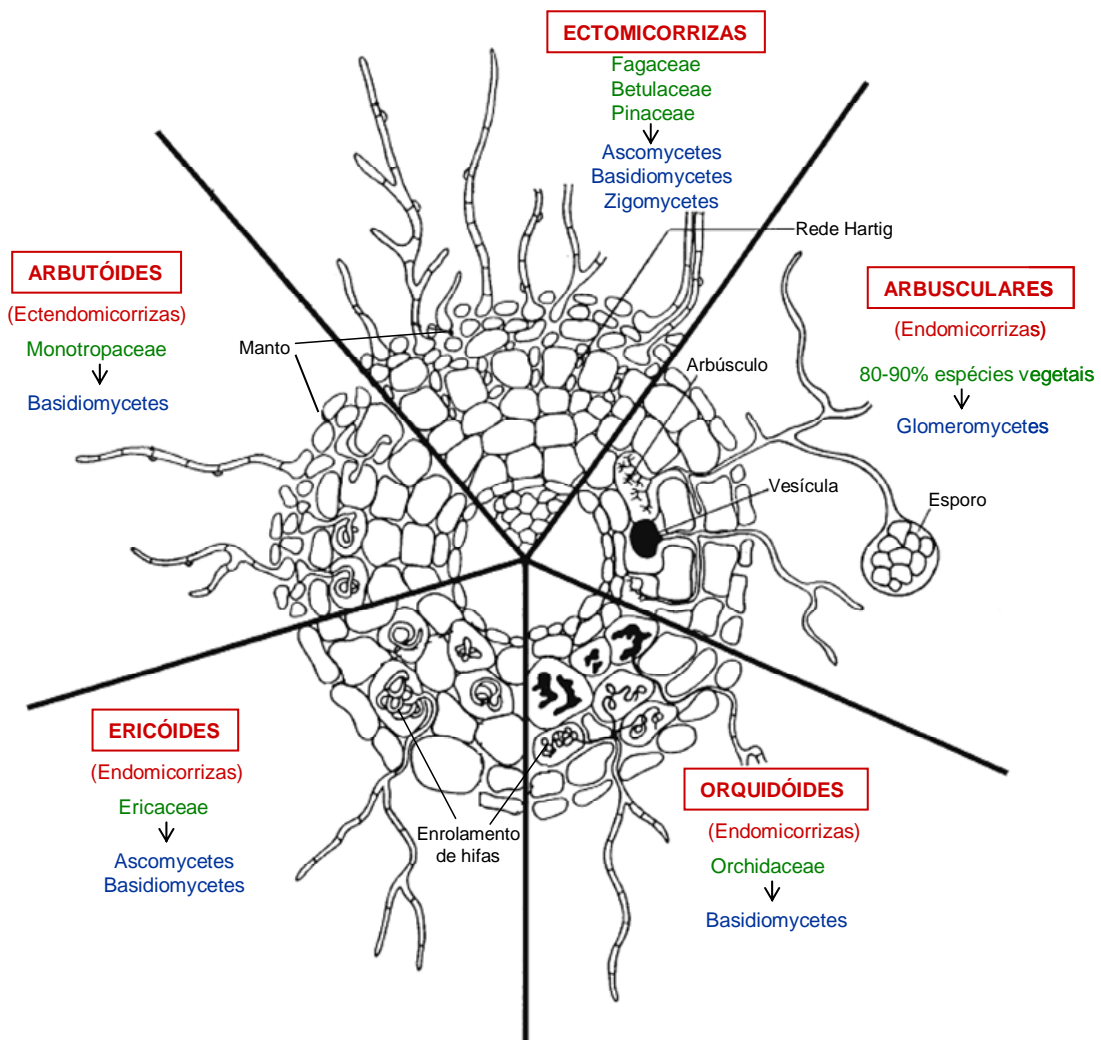
De acordo com as suas características morfofuncionais, as micorrizas são classificadas em três grupos distintos: endomicorrizas (incluindo as micorrizas arbusculares, orquidóides e ericóides), ectomicorrizas e ectendomicorrizas (incluindo as micorrizas arbutóides e monotropóides) (Figura 1.1). As principais características das endomicorrizas são a ausência de manto fúngico à superfície radicular e o crescimento inter- e intracelular das hifas nas células corticais da raiz (Smith & Read, 1997). Nas ectomicorrizas, as hifas do fungo desenvolvem-se entre os espaços intercelulares das células da raiz, ao nível da epiderme ou até à endoderme (típico nas gimnospérmicas), formando uma estrutura designada por rede de Hartig. É também característico desta associação o desenvolvimento de um emaranhado denso de hifas sobre a superfície da raiz, constituindo o designado manto (Smith & Read, 1997). As ectendomicorrizas, tal como o nome indica, são caracterizadas por apresentarem estruturas fúngicas das endo- e das ectomicorrizas, tais como um manto pouco desenvolvido, rede de Hartig e uma ligeira penetração das hifas no interior das células corticais radiculares, formando enrolamentos (Yu *et al.*, 2001).

As micorrizas arbusculares constituem a associação micorrízica mais amplamente distribuída na natureza e a mais estudada. Cerca de 80-90% das plantas terrestres estabelecem este tipo de associação, e dentro deste grupo, encontram-se a maioria das espécies agrícolas. Os fungos que intervêm nesta associação foram recentemente classificados como pertencentes ao filo Glomeromycota, classe Glomeromycetes (Schüßler *et al.*, 2001; Walker & Schüßler, 2004). As micorrizas arbusculares caracterizam-se pela presença de arbúsculos, no interior das células corticais da raiz, que permitem a troca de nutrientes entre o fungo e a planta hospedeira. A maioria destes fungos produz também uma outra estrutura, as vesículas, cuja função parece estar relacionada com o armazenamento de produtos de reserva (Figura 1.1) (Smith & Read, 1997).

As micorrizas orquidóides são formadas por fungos pertencentes à classe Basidiomycetes, que se associam exclusivamente a plantas da família Orchidaceae. Estas espécies apresentam, após germinação, uma fase de crescimento heterotrófica, requerendo compostos carbonados que serão cedidos pelo fungo. A principal

característica deste tipo de micorrizas é a formação de novelos de micélio no interior das células do córtex da raiz (Figura 1.1) (Smith & Read, 1997).

As micorrizas ericóides são estabelecidas por fungos pertencentes sobretudo à classe Ascomycetes, e em menor extensão à classe Basidiomycetes, e associam-se a algumas plantas da família Ericaceae, como as azáleas (*Rhododendron* sp.) e os mirtilos (*Vaccinium* sp.). Estas associações têm também sido descritas em alguns membros da família Epacridaceae e Empetraceae. As micorrizas ericóides caracterizam-se por apresentarem, no interior das células corticais da raiz, espirais de micélio mais ou menos denso (Figura 1.1) (Smith & Read, 1997).



**Figura 1.1** Representação esquemática dos principais tipos de micorrizas. São apresentadas as estruturas típicas de cada um dos tipos de micorrizas, assim como os principais simbiontes (a verde – plantas; a azul – fungos) (adaptado de Selosse & Le Tacon, 1998).

A associação ectomicorrízica, com características estruturais das endo- e das ectomicorrizas, ocorre entre fungos da classe Basidiomycetes e as espécies pertencentes às sub-famílias Arbutoideae (constituindo as micorrizas arbutóides) ou Monotropoideae (constituindo as micorrizas monotropóides) (Smith & Read, 1997; Yu *et al.*, 2001).

As ectomicorrizas constituem o grupo de micorrizas mais importantes em espécies arbóreas, estando presentes em 25 famílias de espécies vasculares, das quais a maioria é lenhosa (Wilcox, 1990). Os fungos envolvidos nesta associação pertencem às classes Basidiomycetes, Ascomycetes e em menor extensão à Zigomycetes (Smith & Read, 1997). Muitos destes fungos exibem interesse comercial por originarem estruturas reprodutoras (cogumelos) com elevado valor gastronómico (*Tuber* spp., *Cantharellus* spp., *Boletus* spp., *Amanita* spp., entre outros). O castanheiro é capaz de estabelecer associação com numerosas espécies de fungos ectomicorrízicos, estando descritos os efeitos positivos para a planta após micorrização com *Pisolithus tinctorius* (Martins, 1997; Martins *et al.*, 1997). Esta associação promove um aumento da disponibilidade de nutrientes minerais, do crescimento e da produtividade das plantas, facilitando ainda o processo de aclimação de plantas micropropagadas (Martins, 1997; Martins *et al.*, 1997; Martins, 2004). A micorrização com *P. tinctorius* aumenta ainda a taxa de sobrevivência de plantas de castanheiro infectadas com o fungo causador da doença da “tinta” (Martins, 2004).

Constitui objectivo deste trabalho contribuir para o esclarecimento dos mecanismos associados às interacções que ocorrem entre os fungos do solo e entre estes e as plantas nos soutos transmontanos. Foi avaliada a diversidade e a dinâmica populacional dos fungos do solo no seu *habitat* natural, mediante a monitorização dos seus corpos de frutificação - os cogumelos (Capítulo 3). A progressão e sucessão de cogumelos ao longo do tempo são fundamentais para a compreensão das interacções entre fungos, em especial dos micorrízicos e não-micorrízicos. Dado o efeito benéfico da micorrização no crescimento e nutrição de castanheiros e efeito protector contra patogénicos, a interacção de *P. tinctorius* com outros fungos presentes na rizosfera do castanheiro poderá revelar-se importante na sustentabilidade dos soutos. Sendo assim, neste trabalho foi estudada a interacção entre o fungo ectomicorrízico *P. tinctorius* e fungo não micorrízico *Hypholoma fasciculare* (Capítulo 4). Este estudo reveste-se de particular importância pelo facto de *H. fasciculare*, isolado de carpóforos naturalmente

infectados de *Amanita muscaria* (L.) Lam. colhidos num souto em Oleiros (Bragança), exibir um comportamento agressivo contra plântulas de castanheiro, as quais apresentavam clorose, queda prematura das folhas e enegrecimento das raízes. A interação de ambos os fungos com as raízes de castanheiro foi ainda estudada, em condições controladas, de modo a avaliar o mecanismo de reconhecimento nas primeiras horas de contacto planta-fungo (Capítulo 5). Com a realização deste trabalho espera-se contribuir para o desenvolvimento de estratégias que promovam a sustentabilidade e produtividade da cultura do castanheiro, nas suas diferentes vertentes, com grande importância económica e sócio-cultural na região transmontana.



## **CAPÍTULO 2**

### **Material e Métodos**



## 2.1 MATERIAL

### 2.1.1 Material biológico

As plântulas de castanheiro (*Castanea sativa* Mill.) foram obtidas por cultura hidropónica (ver secção 2.2.4), a partir de sementes provenientes de um povoamento de castanheiros bravos localizado na região de Bragança (Grandais).

Foram utilizadas duas espécies fúngicas - o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch e o fungo saprófita-lenhícola *Hypholoma fasciculare* (Huds.) P. Kumm.. O micélio de *P. tinctorius* (isolamento 289/Marx) foi cedido gentilmente pelo Instituto Botânico da Universidade de Tübingen (Alemanha). O micélio de *H. fasciculare* foi obtido a partir de carpóforos de *Amanita muscaria* (L.) Lam., colhidos em plantações de *C. sativa* na região de Bragança (ver secção 2.2.2).

### 2.1.2 Reagentes e kits

Na manipulação do DNA foram utilizados reagentes com grau de pureza para Biologia Molecular e água ultrapura (Millipore, Milli-Q) para preparação de soluções. Os kits utilizados em técnicas de Biologia Molecular apresentam-se descritos na tabela 2.1.

Todos os reagentes utilizados, na determinação das espécies reactivas de oxigénio, das enzimas de stresse oxidativo (superóxido dismutase e catalase), bem como nas preparações histológicas, eram de qualidade analítica ou semelhante, e não foram submetidos a qualquer purificação adicional.

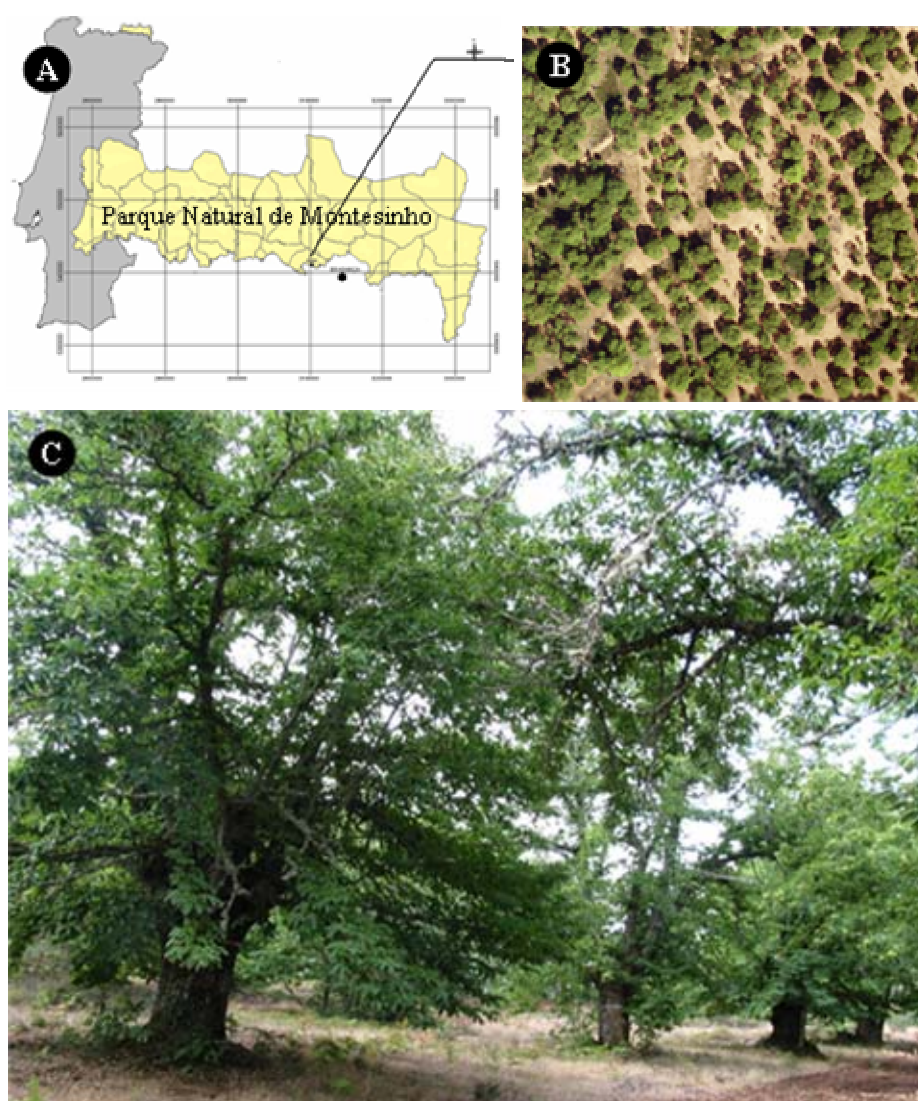
**Tabela 2.1** Kits utilizados em técnicas de Biologia Molecular e objectivo da sua utilização.

Kit	Objectivo
<i>DNeasy Plant Mini Kit</i> (Qiagen)	Extracção de DNA de micélio
<i>JETquick PCR product purification Kit</i> (Genomed)	Purificação de fragmentos de DNA obtidos por amplificação termocíclica

## 2.2 MÉTODOS

### 2.2.1 Avaliação da diversidade macrofúngica associada a *Castanea sativa* Mill.

A recolha dos macrofungos efectuou-se num souto não mobilizado, com uma idade de instalação superior a 100 anos, localizado em Oleiros (concelho e distrito de Bragança), na zona do Parque Natural de Montesinho (PNM) (Figura 2.1). Neste povoamento estabeleceram-se 5 parcelas de amostragem, cada uma com uma área de 100 m<sup>2</sup>, cujas características gerais se encontram referidas na tabela 2.2.



**Figura 2.1** Souto (*Castanea sativa* Mill.) utilizado para a realização do estudo de diversidade macrofúngica. Localização geográfica (A), vista aérea (B) e pormenor das parcelas amostradas (C).

No Outono de 2002, foram recolhidas amostras de solo das parcelas amostradas, à profundidade de 20 cm para análises ulteriores. O teor em azoto total foi determinado segundo o método Kjeldahl (Bremner, 1996) e os teores de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e K<sub>2</sub>O assimiláveis foram determinados pelo método Égner-Riehm (MAP, 1977). O teor em matéria orgânica foi determinado pelo método Walkley-Black (Nelson & Sommers, 1996) e o valor de pH pelo método da relação solo:solução 1:2,5, utilizando-se como soluções água destilada e KCl 1M (Thomas, 1996).

**Tabela 2.2** Caracterização geral das parcelas de amostragem.

Coordenadas UTM	29T PG 80 9 36 1
Latitude	41° 51' 17''
Longitude	6° 50' 33,8''
Altitude	915 m (Carta Militar nº 24, escala 1:25 000)
Vegetação	Giestas ( <i>Genista</i> sp.), tojo ( <i>Ulex</i> sp.)
Observações	Local com indícios de intervenções: pastoreio, controlo da vegetação espontânea e apanha de castanha.

Durante o período em estudo, iniciado em Setembro de 2002 e terminado em Dezembro de 2005, o registo de dados climáticos foi efectuado pelo posto meteorológico da Quinta de Santa Apolónia (Bragança), do Instituto Politécnico de Bragança, por ser este o mais próximo das parcelas amostradas e se encontrar a uma altitude próxima das mesmas parcelas.

### 2.2.1.1 Recolha e identificação dos carpóforos

As colheitas de cogumelos foram efectuadas desde Setembro de 2002 até Dezembro de 2005 com excepção dos meses de Janeiro, Fevereiro, Março e Agosto. Durante o período de Outono e Primavera, as colheitas foram realizadas semanalmente e nos restantes períodos do ano efectuadas quinzenalmente.

Em cada parcela procedeu-se à colheita de todos os cogumelos. Estes eram colhidos integralmente e devidamente identificados com a parcela. Sempre que necessário, procedeu-se ao registo de características consideradas relevantes ou efémeras, em relação a alguns exemplares, como por exemplo odor; cor do leite; sabor; presença de cortina, de volva ou anel; comportamento da carne ao corte; bem como ao

registo fotográfico. Em laboratório, os cogumelos eram separados por espécie, identificados, fotografados, contados, e pesados após desidratação.

As identificações dos carpóforos basearam-se na observação e registo das características macroscópicas (píleo, himénio e estipe) e microscópicas e em testes macroquímicos. A identificação foi efectuada de acordo com Marchand (1971-1986), Moser (1983), Breitenbach & Kränzlin (1984-2000), Alessio (1985), Bon (1988), Noordeloos (1988-2001), Candusso & Lanzoni (1990), Bas *et al.* (1990-2001), Pegler *et al.* (1995), Courtecuisse & Duhem (1995; 2005), Pegler *et al.* (1997) e Courtecuisse (1999). A classificação seguida foi a de Kirk *et al.* (2001) e a nomenclatura baseada no *Index Fungorum* (<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>).

A observação macroscópica das características externas dos cogumelos, em particular dos macrofungos agaricoides - macrofungos cujas frutificações são constituídas por um pé (estipe) e um chapéu (píleo) - incidiram sobretudo ao nível do:

- Píleo: diâmetro, forma global, forma da margem, cor, consistência, viscosidade e revestimento da cutícula, aroma, sabor;
- Himénio: forma (lâminas ou tubos), cor e alterações de cor ao toque, sabor, tipo de inserção, espaçamento e existência de secreções (leite);
- Estipe: forma, cor, dimensões (diâmetro e altura), consistência, existência ou não de anel, tipo de anel, existência ou não de volva, tipo de volva, viscosidade e ornamentação da cutícula do pé, aroma e sabor;
- Esporada (marca de libertação de esporos em papel), que permite visualizar a cor dos esporos em massa. Para a sua obtenção selecciona-se um exemplar fresco e maduro, corta-se o estipe pelo ápice (zona superior, mais próxima do píleo). O píleo é colocado sobre um papel, com o himenóforo virado para baixo, em câmara húmida. A realização de esporadas foi essencialmente efectuada na identificação de determinados grupos de macrofungos sobretudo pertencente ao género *Russula*.

A realização de testes macroquímicos foi relevante na identificação de alguns exemplares pertencentes aos géneros *Cortinarius*, *Xerocomus*, *Amanita* e *Russula*. Para o efeito, foi depositado sobre os carpóforos uma gota de sulfato de ferro 10% (p/v), ácido sulfúrico concentrado, hidróxido de sódio 30% (p/v) ou amoníaco à concentração comercial, tendo sido avaliada a alteração de cor do carpóforo (Moreno, 2005).

### 2.2.1.2 Conservação dos carpóforos

Os exemplares colhidos foram desidratados, por incubação a 30°C, durante 72 h. O material desidratado foi pesado, etiquetado e armazenado no Herbário Micológico da Escola Superior Agrária de Bragança.

### 2.2.1.3 Tratamento dos resultados

Para avaliar o nível de semelhança na composição de espécies macrofúngicas, entre os diferentes anos de estudo e entre os diferentes pares de combinações de épocas de frutificação (Outono e Primavera), utilizou-se o índice de similaridade de *Sorensen* ( $C_s$ ) (Soberón & Llorente, 1993). Este índice (Equação 2.1), calculado recorrendo ao programa *Community Analysis Package* (versão 3.0), avalia o grau de similaridade, em termos de número de espécies comuns, entre duas amostras (1 e 2).

$$C_s = \frac{2a}{2a + b + c} \quad (\text{Equação 2.1})$$

Sendo:

$a$ , o número de espécies comuns às duas amostras

$b$ , o número de espécies que ocorrem apenas na amostra 1

$c$ , o número de espécies que ocorrem apenas na amostra 2

A relação gráfica entre o somatório de novas espécies registadas e o número de amostragens ou esforço da amostragem dispendido para as encontrar foi determinada recorrendo ao programa *EstimateS* (versão 6.0), tendo sido ajustada pela equação de Clench (Equação 2.2; Soberón & Llorente, 1993).

$$E(s) = \frac{ax}{1 + bx} \quad (\text{Equação 2.2})$$

Sendo:

$E(s)$ , o número esperado de espécies novas ocorrentes em cada  $x$  pontos de amostragem

$a$ , a ordenada na origem

$b$ , o declive da recta

$x$ , o número cumulativo de amostras (esforço da amostragem)

A diversidade de espécies macrofúngicas, entre os diferentes anos estudados, foi comparada mediante o cálculo dos índices de diversidade de *Simpson* ( $D$ ) (Equação 2.3;

Southwood & Henderson, 2000) e de *Shannon-Wiener* ( $H'$ ) (Equação 2.4; Southwood & Henderson, 2000).

$$D = \sum_{i=1}^s p_i^2 \quad (\text{Equação 2.3})$$

$$H' = \sum_{i=1}^s p_i * \ln p_i \quad (\text{Equação 2.4})$$

Sendo:

$$p_i = n_i/N$$

$n_i$ , número de indivíduos da espécie  $i$

$N$ , número total de indivíduos colhidos

$s$ , o número total de espécies da amostra

$\ln p_i$ , logaritmo na base 2 de  $p_i$

Ambos os índices foram calculados recorrendo ao programa *Species Diversity and Richness* (versão 3.0). O índice de *Simpson* exprime a abundância das espécies mais comuns, enquanto que o índice de *Shannon-Wiener*, tradicionalmente designado como índice de *Shannon*, apresenta como pressuposto que, numa amostra aleatória retirada de uma população infinitamente grande, todas as espécies da comunidade se encontram representadas (Southwood & Henderson, 2000).

A medição da correlação entre os factores climáticos (temperatura média, mínima, máxima, e pluviosidade total) e o número de carpóforos e de espécies macrofúngicas (total, micorrízica e não micorrízica) foi efectuada mediante o cálculo do coeficiente de correlação de *Spearman*,  $r_s$  (Equação 2.5; Dagnelis, 1973) recorrendo ao programa estatístico *SAS* (versão 9.1).

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum_{i=1}^n di^2}{n(n^2 - 1)} \quad (\text{Equação 2.5})$$

Sendo:

$N$ , o tamanho da amostra

$di$ , as diferenças entre os números de ordem  $x$  e  $y$  do indivíduo  $i$

A correlação foi estabelecida com os valores médios de temperatura média, mínima e máxima, e de precipitação total, recolhidos 3, 5, 10, 15, 20 e 30 dias previamente à data de colheita dos macrofungos. Este coeficiente de correlação mede a intensidade da

relação existente entre duas variáveis aleatórias cujo valor pode variar entre -1 a 1 designando-se, no primeiro caso, como uma relação inversa e no segundo uma relação directa. Um valor absoluto próximo de zero indica que as variáveis não se correlacionam ou se encontram fracamente correlacionas (Dagnelis, 1973).

### 2.2.2 Cultura e manutenção de *Pisolithus tinctorius* e *Hypholoma fasciculare*

O micélio de *H. fasciculare* foi obtido a partir de carpóforos de *A. muscaria* colhidos em plantações de *C. sativa* na região de Bragança (Oleiros). Nos carpóforos, naturalmente infectados com *H. fasciculare*, foi efectuada uma incisão na cutícula do chapéu e do pé, expondo as porções estéreis do carpóforo. Porções do micélio interior (com cerca de 0,25 cm<sup>2</sup> de área) foram transferidas em condições de assepsia para meio de cultura gelificado Melin-Norkrans (MMN), pH 6,6 (Marx, 1969; Brundrett *et al.*, 1996). O crescimento do fungo ocorreu no escuro, a uma temperatura de 23–25°C.

As culturas axénicas de *P. tinctorius* e de *H. fasciculare* foram efectuadas em meio Melin-Norkrans (MMN), pH 6,6 (Marx, 1969). As culturas foram incubadas no escuro, a 23–25°C. A sub-cultura dos fungos foi efectuada em intervalos de três semanas.

O micélio utilizado para inoculação das plântulas de castanheiro foi obtido por cultura em frascos de 750 mL de capacidade contendo 200 mL de meio MMN líquido modificado. O meio foi inoculado com 15 inóculos (0,5 cm de diâmetro), provenientes da região periférica das culturas em crescimento activo em meio MMN gelificado. O crescimento das culturas ocorreu no escuro, sem agitação e a 23-25°C, até evidenciar micélio denso.

---

**Meio MMN:** NaCl 0,025 g/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,25 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,50 g/L; FeCl<sub>3</sub> 0,050 g/L; CaCl<sub>2</sub> 0,50 g/L; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,15 g/L; tiamina 0,10 g/L; casaminoácidos 1,0 g/L; extracto de malte 10 g/L; glucose 10 g/L; agar 20 g/L

**Meio líquido MMN modificado:** NaCl 0,025 g/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,25 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,50 g/L; FeCl<sub>3</sub> 0,050 g/L; CaCl<sub>2</sub> 0,50 g/L; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,15 g/L; tiamina 0,10 g/L; glucose 5 g/L

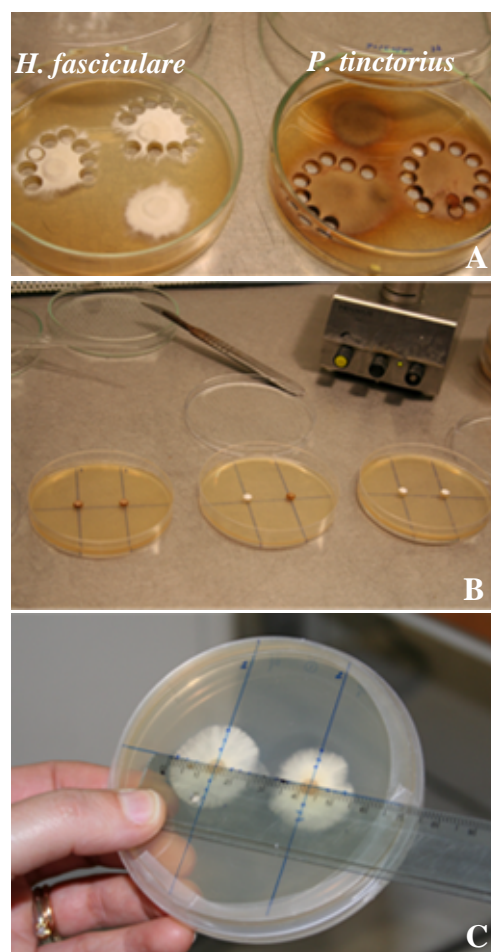
---

### 2.2.3 Ensaios de co-cultura *Pisolithus tinctorius* - *Hypholoma fasciculare*

#### 2.2.3.1 Estabelecimento das co-culturas

O potencial antagonista do fungo saprófita-lenhícola *H. fasciculare* contra o fungo ectomicorrízico *P. tinctorius* foi avaliado em co-cultura (Figura 2.2). No

estabelecimento de co-culturas (*P. tinctorius*-*H. fasciculare*; *H. fasciculare*-*H. fasciculare* e *P. tinctorius*-*P. tinctorius*), foram utilizadas caixas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo 10 mL de meio MMN gelificado, pH 6,6. Inóculos de *P. tinctorius* e/ou *H. fasciculare* (com cerca de 0,5 cm de diâmetro), retirados das regiões periféricas das respectivas culturas em crescimento activo, foram transferidos para o meio MMN e colocados a uma distância de 3 cm entre si. A incubação das culturas foi efectuada no escuro, a uma temperatura de 23–25°C. Foram preparadas seis caixas de Petri para cada combinação fúngica e o ensaio foi realizado por duas vezes.



**Figura 2.2** Estabelecimento de ensaios de co-cultura de *Pisolithus tinctorius* - *Hypholoma fasciculare*. Da região periférica das culturas de *H. fasciculare* e de *P. tinctorius* em meio MMN em crescimento activo foram retiradas secções de agar, com 0,5 cm de diâmetro (A). Os inóculos relativos aos dois fungos foram transferidos para meio MNN (contido em caixa de Petri com 9 cm de diâmetro), de modo a que distância entre eles fosse de 3 cm (B). Foram efectuadas três combinações fúngicas: *P. tinctorius*-*H. fasciculare* e *P. tinctorius*-*P. tinctorius*, *H. fasciculare*-*H. fasciculare*, sendo estas duas últimas os controlos do ensaio de co-cultura. O crescimento radial das colónias fúngicas foi determinado, em intervalos de tempo regulares, durante 19 dias após inoculação (C).

### 2.2.3.2 Parâmetros avaliados nas co-culturas

Os valores dos raios (interno, na região inter-inóculos e externo, na regiões diametralmente opostas) das colónias fúngicas foram determinados durante dezanove dias. Foram ainda determinados os acréscimos diários do crescimento radial das colónias fúngicas, sendo os resultados expressos em mm/dia.

A caracterização morfológica das colónias fúngicas foi efectuada registando as modificações que ocorriam ao nível da textura do micélio, formação de cordão micelial, formação de halo, forma e cor da colónia na face inferior e superior, forma da margem da colónia, e alteração da cor do meio de cultura.

A morfologia das hifas na zona de interacção fúngica foi analisada ao fim de 25 dias de co-cultura, por microscopia óptica e por microscopia electrónica de varrimento. Para observação ao microscópio óptico, porções de micélio da zona de interacção das diferentes combinações fúngicas (*P. tinctorius-H. fasciculare*; *H. fasciculare-H. fasciculare*; *P. tinctorius-P. tinctorius*), foram montadas em água e observadas sem tratamento ulterior num microscópio Leica, modelo CTR 5000. Para observação em microscopia electrónica de varrimento, secções de agar (com cerca de 0,5 cm de diâmetro) contendo micélio provenientes da zona de interacção das diferentes combinações fúngicas (*P. tinctorius-H. fasciculare*; *H. fasciculare-H. fasciculare*; *P. tinctorius-P. tinctorius*), foram fixadas utilizando o procedimento descrito na secção 2.2.9.

A acidificação do meio de interacção foi avaliada em co-culturas nas mesmas condições, pela adição de Azul de Bromocresol 0,006% (p/v) ao meio de cultura MMN, pH 6,6. A mudança de cor do meio de cultura, de azul para amarelo, permite avaliar a acidificação do meio (Yan *et al.*, 2002).

---

**Meio MMN:** NaCl 0,025 g/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,25 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,50 g/L; FeCl<sub>3</sub> 0,050 g/L; CaCl<sub>2</sub> 0,50 g/L; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,15 g/L; tiamina 0,10 g/L; casaminoácidos 1,0 g/L; extracto de malte 10 g/L; glucose 10 g/L; agar 20 g/L

---

### 2.2.4 Obtenção de plântulas de *Castanea sativa* em cultura hidropónica

A germinação de sementes de castanheiro foi efectuada em assépsia, tendo sido utilizado como substrato areia hidratada com água da torneira. As sementes foram desinfectadas em hipoclorito de sódio [5% (p/v) cloro activo], durante 1 hora e sob

agitação (100 rpm). Após quatro lavagens em água destilada estéril, as sementes foram transferidas para caixas de plástico de 5000 mL de capacidade contendo areia hidratada estéril, que posteriormente foram seladas com película aderente. A esterilização do substrato foi efectuada por incubação a 120°C, durante 1 hora. A germinação das sementes decorreu no escuro, a 5-10°C, durante dois meses.

O crescimento das plântulas foi feito em assépsia, tendo sido utilizados frascos de 1500 mL de capacidade contendo 250 mL de água da torneira, nos quais foi introduzido uma rede de plástico suspensa por arames plastificados. Os frascos foram esterilizados duas vezes com um intervalo de 4 dias, em autoclave durante 1 hora, a 120°C. Após germinação, as sementes foram submetidas a uma nova desinfeção em hipoclorito de sódio [2,5% (p/v) cloro activo] durante 15 minutos, seguida por três lavagens em água destilada estéril. Após desinfeção, procedeu-se à poda da radícula das sementes, de forma a promover a ramificação do sistema radicular. Em cada frasco foram depositadas na rede de plástico três sementes germinadas. Os frascos foram mantidos no escuro, a 19°C, até o desenvolvimento da parte aérea. Após o aparecimento das primeiras folhas, que ocorreu ao fim de dois meses, as plântulas foram incubadas à mesma temperatura, mas sob fotoperíodo de 16h de luz/ 8h de escuro e a uma intensidade luminosa de 2000 lux, durante dois meses, até à obtenção de plântulas com um sistema radicular bem desenvolvido, as quais foram utilizadas para os ensaios de interacção.

### **2.2.5 Inoculação das plântulas de *Castanea sativa***

A inoculação das plântulas de castanheiro foi efectuada por transferência do micélio de *P. tinctorius* ou *H. fasciculare* (4g peso fresco/frasco) para os frascos contendo as plântulas com cerca de quatro meses, com um sistema radicular bem desenvolvido. O micélio utilizado, proveniente das culturas axénicas em meio líquido, foi extensivamente lavado com água destilada estéril. Após transferência, os frascos de cultura foram ligeiramente agitados, de modo a promover uma distribuição uniforme do micélio, e incubados nas condições descritas em 2.2.4. Como controlo, foram utilizadas plântulas não inoculadas, crescidas nas mesmas condições.

Foram recolhidas amostras de raízes de castanheiro inoculadas com *P. tinctorius* ou *H. fasciculare* ao fim de 0, 0,5, 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 24 e 48 horas de contacto raiz-fungo. Para cada um dos tempos de inoculação, consideraram-se aleatoriamente quinze

plantas que se subdividiram em três grupos, de cinco plantas cada. O mesmo procedimento foi efectuado para as plantas controlo. Após colheita, as raízes foram imediatamente sujeitas a análise ou maceradas em azoto líquido e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **2.2.6 Efeito do extracto proteico de raízes de castanheiro eliciadas com *P. tinctorius* no crescimento do fungo *P. tinctorius***

Extractos de raízes de castanheiro, inoculadas com o fungo *P. tinctorius* e preparados ao longo do tempo de eliciação (0-48h), foram avaliados quanto à capacidade de influenciar o crescimento do fungo micorrízico *P. tinctorius* (Figura 2.3). Raízes de castanheiro inoculadas com *P. tinctorius* ao fim de 0, 0,5, 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 24 e 48h (secção 2.2.5) foram utilizadas para a preparação de extractos proteicos (secção 2.2.8). Após quantificação de proteína, os extractos proteicos foram aferidos para uma concentração final de  $0,24 \mu\text{g}$  de proteína  $\mu\text{L}^{-1}$ , e filtrados (filtros de  $0,45 \mu\text{m}$ , Millipore). Aliquotas de  $100 \mu\text{L}$  dos extractos filtrados foram uniformemente espalhadas sobre  $10 \text{ mL}$  de meio MMN gelificado, pH 6,6, contido em caixas de Petri (9 cm de diâmetro). Nas placas de Petri controlo foi aplicado o mesmo volume de tampão utilizado no processo de extracção de proteínas. A inoculação foi efectuada por transferência de um inóculo de *P. tinctorius* (aproximadamente 0,5 cm de diâmetro), retirado da região periférica das culturas em crescimento activo. A incubação das culturas foi efectuada no escuro, a  $23\text{--}25^{\circ}\text{C}$ . Foram efectuados cinco ensaios para cada tempo de inoculação.

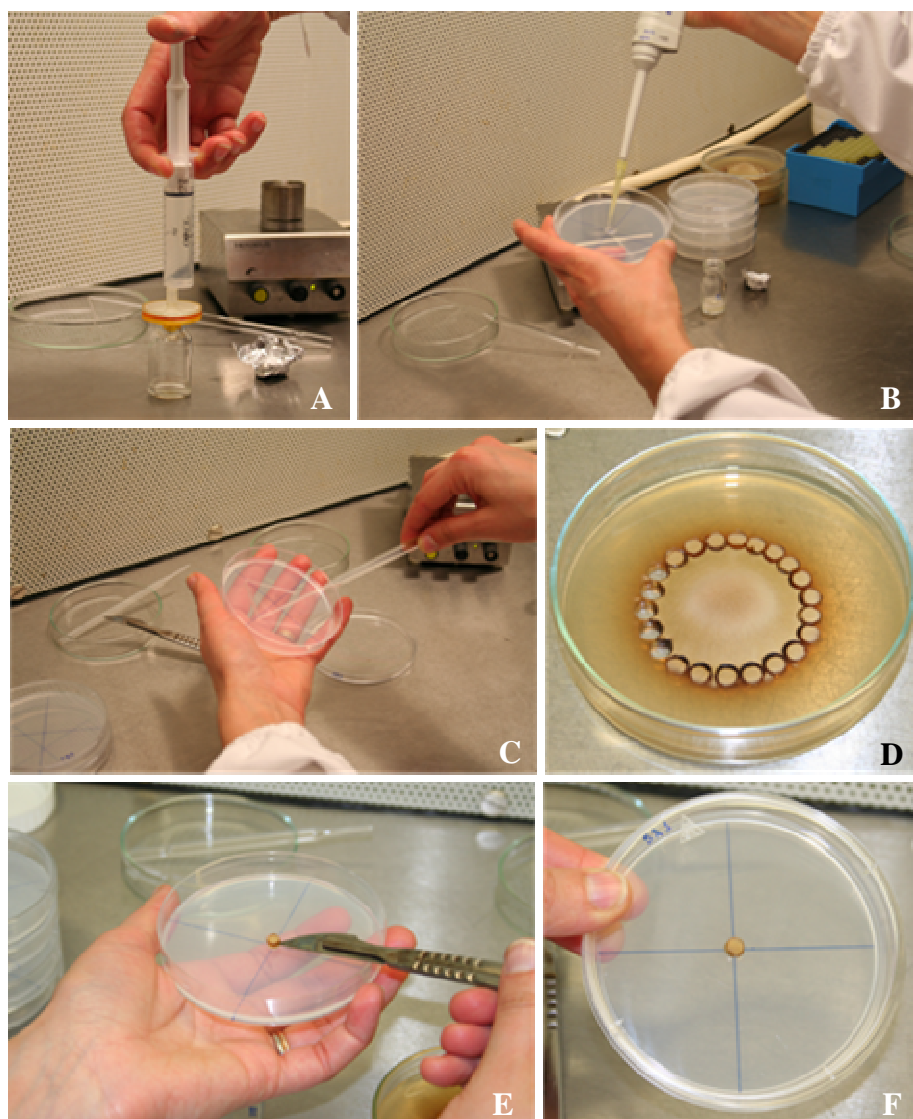
Os quatro raios das colónias fúngicas foram avaliados durante trinta dias de incubação. Foi ainda determinado o crescimento radial das colónias fúngicas, ao fim de 8 e 17 dias de inoculação, sendo os resultados expressos em mm/dia.

As características macroscópicas das colónias de *P. tinctorius* em crescimento foram avaliadas, nomeadamente, a coloração do micélio, presença de micélio aéreo, presença de exsudados, cor do agar e margem da colónia (regular ou irregular) (Burgess *et al.*, 1995).

---

**Meio MMN:** NaCl 0,025 g/L;  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0,25 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,50 g/L;  $\text{FeCl}_3$  0,050 g/L;  $\text{CaCl}_2$  0,50 g/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,15 g/L; tiamina 0,10 g/L; casaminoácidos 1,0 g/L; extracto de malte 10 g/L; glucose 10 g/L; agar 20 g/L

---



**Figura 2.3** Estabelecimento do ensaio para avaliar a capacidade do extracto proteico de raízes de castanheiro eliciadas com *Pisolithus tinctorius* influenciar o crescimento do fungo micorrízico *P. tinctorius*.

Os extractos proteicos, provenientes de raízes de castanheiro eliciadas com *P. tinctorius*, foram esterilizados por filtração (A). Aliquotas de 100  $\mu\text{L}$  de extracto proteico estéril foram transferidas para a superfície de 10 mL de meio MMN gelificado (B) e espalhados uniformemente (C). Na região periférica das culturas de *P. tinctorius* em crescimento activo foram retirados secções de agar, com 0,5 cm de diâmetro (D), os quais foram utilizados na inoculação dos meios de cultura contendo o extracto proteico (E). O crescimento radial das colónias fúngicas foi avaliado (F), para os quatro raios, em intervalos de tempo regulares, durante 30 dias após inoculação.

## 2.2.7 Avaliação de stresse oxidativo

### 2.2.7.1 Quantificação de peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

A quantificação de peróxido de hidrogénio foi efectuada espectrofotometricamente segundo Loreto & Velikova (2001) em amostras de raiz de castanheiro inoculadas com *P. tinctorius* ou *H. fasciculare*. Cerca de 70 mg de material a analisar, previamente macerado em azoto líquido, foi homogeneizado em 2 mL de ácido tricloroacético 0,1% (p/v). Após centrifugação a 14 000 g, durante 15 min a 4°C, recolheu-se do sobrenadante uma alíquota de 0,5 mL, a qual foi adicionada a 0,5 mL de tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0 e a 1 mL de KI 1 M. Procedeu-se em seguida à determinação do valor de absorvância a 390 nm, num espectrofotómetro UV-Vis Milton Roy 1200, equipado com uma célula de fluxo contínuo termostaticada. A quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> existente nas diferentes amostras foi extrapolada utilizando uma recta de calibração, previamente determinada com sete concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conhecidas. Para cada tempo de inoculação foram efectuadas três repetições, e para cada repetição foram efectuadas três determinações.

### 2.2.7.2 Detecção histológica do anião superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)

A produção do anião superóxido foi avaliada em raízes de plântulas de castanheiro que estiveram em contacto com o fungo *P. tinctorius* ou *H. fasciculare*. A detecção histoquímica foi efectuada segundo o método de redução do Nitroazul de Tetrazólio (NBT) pelo O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Romero-Puertas *et al.*, 2004). Secções de segmentos de raiz com cerca de 3 cm de comprimento, previamente lavados em água corrente, foram incubados em NBT 0,05% (p/v) em tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7,5, à temperatura ambiente, durante 30 min. Após incubação, o material foi fixado numa solução etanol/ácido láctico/glicerol [4:1:1 (v/v/v)], a 90°C, durante 5 min. O material foi então montado em glicerol 60% (v/v), e observado num microscópio Leitz Laborlux 12. A produção de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> foi evidenciada pelo aparecimento de coloração azul, resultante da formação de formazano (insolúvel), originado a partir da redução do NBT pelo anião superóxido.

### 2.2.7.3 Determinação da actividade de enzimas de stresse oxidativo

A determinação da actividade de enzimas envolvidas na remoção de espécies reactivas de oxigénio foi efectuada num espectrofotómetro UV-Vis Milton Roy 1200, equipado com uma célula de fluxo contínuo termostaticada a 25°C. Os ensaios foram efectuados utilizando extractos proteicos (ver secção 2.2.8), preparados a partir de raízes de plântulas de castanheiro inoculadas com o fungo *P. tinctorius* ou *H. fasciculare* para diferentes tempos de contacto raiz-fungo (0-48h) (ver secção 2.2.5).

#### *Superóxido dismutase (SOD)*

A actividade da superóxido dismutase (EC 1.15.1.1) foi determinada espectrofotometricamente segundo o método fotoquímico do Nitrozul de Tetrazólio (NBT) (Beyer & Fridovich, 1987). Este método baseia-se na capacidade da SOD inibir a redução do NBT pelo  $O_2^{\cdot-}$ , o qual se forma a partir da redução fotoquímica da riboflavina. Inicialmente foi preparada uma mistura de reacção, adicionando 1 mL de 2x tampão de reacção, 200  $\mu$ L NBT 570  $\mu$ M, 200  $\mu$ L de riboflavina 9  $\mu$ M e 600  $\mu$ L de amostra proteica. Após agitação, 1 mL da mistura de reacção foi utilizado para determinar o valor de absorvância a 560 nm, e a solução remanescente foi incubada a 30°C sob luz durante 6 min. A intensidade luminosa tinha sido previamente ajustada de forma a permitir uma variação de 0,142 de absorvância a 560 nm após 6 min de iluminação. A actividade da SOD foi determinada pela diferença de leituras de absorvância a 560 nm, no tempo inicial e após 6 min de iluminação. Os valores obtidos para diferentes concentrações de extractos proteicos foram linearizados segundo o método descrito por Asada *et al.* (1974). Uma unidade de SOD (1 U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para inibir a redução do NBT a 50%, a 25°C e a pH 7,8.

---

**2x Tampão de reacção:** Tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,8, EDTA 0,2 mM, L-metionina 19,8 mM, Triton X-100 0,05% (v/v).

---

#### *Catalase (CAT)*

A actividade da catalase (EC 1.11.1.6) foi determinada espectrofotometricamente segundo o método baseado na decomposição do  $H_2O_2$  a 240 nm (Aebi, 1983). A

reacção decorreu em tampão fosfato de sódio 80 mM pH 7,0, contendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM. A reacção foi iniciada pela adição de extracto proteico (20-50  $\mu\text{L}$ ) para um volume final de 1 000  $\mu\text{L}$ . A decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi avaliada pela determinação do decréscimo da absorvância a 240 nm e a 25°C, e considerando que  $\epsilon(\text{H}_2\text{O}_2; 240 \text{ nm}) = 39,4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Uma unidade de CAT (1 U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para decompor 1  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ , a 25°C e a pH 7,0.

### 2.2.8 Extracção e quantificação de proteínas

Aproximadamente 1 g de raiz, previamente macerada em azoto líquido e armazenada a -80°C, foi homogeneizada em 4 mL de tampão de extracção de proteínas. Após incubação em gelo durante 15 minutos, o extracto foi centrifugado a 14 000 g, durante 20 min a 4°C, sendo o sobrenadante recuperado e mantido no gelo até análise.

A quantificação da proteína foi efectuada espectrofotometricamente pelo método de Azul de Coomassie (Sedmak & Grossberg, 1977). A 1 mL de reagente Azul de Coomassie foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de extracto proteico. Após incubação durante 15 min, à temperatura ambiente, foi determinado o valor de absorvância a 595 nm, num espectrofotómetro UV-Vis Milton Roy 1200. A quantidade de proteína existente nas diferentes amostras foi extrapolada utilizando uma recta de calibração, previamente determinada com sete concentrações de BSA definidas. Para cada tempo de inoculação foram efectuadas três repetições, e para cada repetição foram efectuadas três determinações.

---

**Tampão de extracção de proteínas:** tampão fosfato de sódio 80 mM pH 7,0, benzamidina 1 mM, 2-mercaptoetanol 0,1% (v/v), EDTA 1 mM, triton X-100 0,1% (v/v), polivinilpirrolidona 1,0% (p/v)  
**Reagente Azul de Coomassie:** Azul Brilhante de Coomassie G250 0,06% (p/v), ácido perclórico 1,9% (v/v). Após filtração em papel Whatman® N°1, a solução foi armazenada no escuro à temperatura ambiente.

---

### 2.2.9 Microscopia electrónica de varrimento

Raízes de plântulas de castanheiro em contacto com o fungo *P. tinctorius* durante 2, 12 e 24 horas ou com o fungo *H. fasciculare* durante 2, 25 e 60 dias foram observadas em microscopia electrónica de varrimento. Este procedimento foi igualmente efectuado para o micélio fúngico das co-culturas estabelecidas entre

*P. tinctorius*-*H. fasciculare*, *H. fasciculare*-*H. fasciculare* e *P. tinctorius*-*P. tinctorius*. O material foi fixado em glutaraldeído 2,5% (v/v) em tampão HEPES 0,1M, pH 6,8 durante 24h, e após três lavagens no mesmo tampão, foi pós-fixado em tetróxido de ósmio a 2% (p/v) (Sigma), durante 2h e a 4°C. Após três lavagens em água desionizada, o material foi desidratado numa série ascendente de acetona, até acetona absoluta (10% em cada série, 30 min cada) e transferido para 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano (Merck), durante 1 min. Após montagem no porta amostras do microscópio electrónico de varrimento, o material foi coberto com uma fina camada de ouro e observado num microscópio electrónico de varrimento, Leica, modelo S360, a 15 keV.

## 2.2.10 Técnicas de manipulação de DNA

### 2.2.10.1 Purificação de ácidos nucleicos

#### *Isolamento de DNA genómico de micélio*

A extração de DNA de micélio de *H. fasciculare* ou de *P. tinctorius* crescido em meio líquido MMN (secção 2.2.2), foi efectuada utilizando o kit *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) com algumas modificações das instruções do fabricante. A 0,1 g de micélio, previamente macerado em azoto líquido, foram adicionados 400 µL de tampão de lise AP1 (Qiagen), 4 µL de RNase A (Qiagen), 2 µL de 2-mercaptoetanol e 20 mg de polivinilpolipirrolidona. Após mistura, as amostras foram incubadas à temperatura de 65°C, durante 10 min. A precipitação de polissacáridos e de proteínas foi promovida pela adição de 130 µL de tampão AP2 (Qiagen). Após agitação e incubação no gelo durante 5 min, a mistura foi centrifugada a 20 000 g, durante 5 min. O sobrenadante foi transferido para uma coluna *QIAshredder Mini Spin* (Qiagen), que foi centrifugada a 20 000 g, durante 2 min, de modo a remover os precipitados e resíduos celulares. O filtrado foi recolhido para um novo microtubo, ao qual foram adicionados 1,5 volumes de tampão de ligação AP3/E (Qiagen). Esta mistura foi transferida para uma nova coluna *DNeasy Mini Spin* (Qiagen), a que foi centrifugada a 6 000 g, durante 1 min, ficando o DNA adsorvido à matriz da coluna. A coluna foi lavada por adição de 500 µL de tampão de lavagem AW (Qiagen), e de novo centrifugada a 20 000 g, durante 2 min. Após transferência da coluna para um novo microtubo, o DNA foi eluído pela adição de 30 µL de água ultrapura estéril, seguida de incubação à temperatura ambiente, durante 5 min e de nova centrifugação a 6 000 g, durante 1 min.

### ***Purificação dos fragmentos de DNA amplificados***

Para a purificação dos fragmentos amplificados foi utilizado o sistema de purificação *JETquick PCR product purification* (Genomed). Ao microtubo contendo 100  $\mu\text{L}$  do produto amplificado foi adicionado 400  $\mu\text{L}$  de tampão de ligação (Genomed). Após transferência desta mistura para uma coluna *Jetquick spin column* (Genomed), apoiada num tubo, procedeu-se a uma centrifugação a 12 000 g, durante 1 min, ficando o DNA adsorvido à matriz da coluna. O DNA foi lavado por adição de 500  $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem (Genomed), seguida de uma centrifugação em idênticas condições. Após transferência da coluna para um novo microtubo, promoveu-se a eluição do DNA pela adição de 30  $\mu\text{L}$  de água ultrapura estéril, seguida de incubação à temperatura ambiente, durante 5 min, e de nova centrifugação a 12 000 g durante 2 min.

#### **2.2.10.2 Quantificação espectrofotométrica de DNA**

A concentração de DNA foi estimada pela determinação do valor da absorvância a 260 nm num espectrofotómetro de duplo feixe CARY UV-Vis (Varian), considerando que uma solução com  $A_{260} = 1,0$  corresponde uma concentração de DNA de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A razão  $A_{260}/A_{280}$  foi utilizada como indicador da pureza do DNA, atendendo a que soluções de DNA de elevada pureza exibem razões com valores entre 1,8 e 2,0 (Sambrook *et al.*, 1989).

#### **2.2.10.3 Amplificação termocíclica de DNA**

##### ***Desenho dos iniciadores oligonucleotídicos***

A identificação molecular dos fungos *P. tinctorius* e *H. fasciculare* foi efectuada pela amplificação da região espaçadora transcrita interna (ITS, *internal transcribed spacer*) do rDNA, utilizando o par de iniciadores nucleotídicos *ITS5FO* (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3') e *ITS4RE* (5' TCCTCCGCTTATTGATATG C 3'), respectivamente na orientação directa e inversa (White *et al.*, 1990).

Para a amplificação da região codificante dos genes que codificam hidrofobinas de *H. fasciculare*, foram concebidos iniciadores oligonucleotídicos degenerados para as regiões conservadas de genes codificantes de hidrofobinas de diferentes espécies de

basidiomicetos (*HydHf FO1*, *HydHf FO2* e *HydHf RE*). Após pesquisa de sequências aminoacídicas de hidrofobinas depositadas na base de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), a edição de sequências foi efectuada pelo programa *EditSeq* (DNASTAR) e o seu alinhamento foi efectuado pelo método Clustal através do programa *MegAlign* (DNASTAR). A selecção das sequências para as quais foram concebidos os iniciadores oligonucleotídicos degenerados teve como critério, não só o grau de conservação em diferentes espécies basidiomicetos, mas também o grau de degenerescência e dimensão do fragmento a amplificar.

A síntese dos iniciadores oligonucleotídicos (Tabela 2.3) foi efectuada recorrendo aos serviços da *Metabion*.

**Tabela 2.3** Iniciadores oligonucleotídicos e objectivo da sua utilização.

Par de iniciadores oligonucleotídicos	Objectivo
<i>ITS5FO</i> e <i>ITS4RE</i>	Amplificação da região ITS do rDNA de <i>P. tinctorius</i> e <i>H. fasciculare</i> Sequenciação da região ITS
<i>HydHf FO1</i> e <i>HydHf RE</i>	Amplificação das regiões codificantes dos genes de hidrofobinas de <i>H. fasciculare</i>
<i>HydHf FO2</i> e <i>HydHf RE</i>	Amplificação das regiões codificantes dos genes de hidrofobinas de <i>H. fasciculare</i> Sequenciação da região codificante dos genes de hidrofobinas de <i>H. fasciculare</i>

### **Reacções de amplificação termocíclica**

A amplificação termocíclica da região ITS foi efectuada no termociclador MyCycler (BioRad). A mistura de reacção continha os iniciadores oligonucleotídicos (0,2  $\mu$ M de cada),  $MgCl_2$  2,0 mM, 5  $\mu$ L tampão de PCR 10x (ABgene), dNTPs 0,2 mM, DNA 250 ng e *Taq DNA polymerase* 0,1  $U\mu L^{-1}$  (ABgene) para um volume final de 50  $\mu$ L. O ciclo de temperaturas utilizado na amplificação das regiões ITS foi 95°C durante 3 min (1 ciclo); 95°C durante 1 min, 60°C durante 0,5 min, 72°C durante 1 min (35 ciclos); e 72°C durante 10 min (1 ciclo). O ciclo de temperaturas utilizado na amplificação de regiões codificantes dos genes de hidrofobinas de *H. fasciculare* foi 95°C durante 3 min (1 ciclo); 95°C durante 1 min, 50°C durante 0,5 min, 72°C durante 1 min (35 ciclos); e 72°C durante 10 min (1 ciclo).

#### 2.2.10.4 Separação electroforética de DNA

As separações electroforéticas preparativas e analíticas de fragmentos de DNA foram efectuadas em tinas horizontais (BioRad), através de geis de agarose 1,2% ou 2% (p/v) em 0,5x TBE. As amostras de DNA, assim como os marcadores de massa molecular (*1kb* ou *100 pb DNA Ladder*, Promega), foram aplicados nos poços dos geis após adição de 0,25 volumes de tampão de aplicação 4x contendo 1  $\mu$ L de brometo de etídio. A separação electroforética foi efectuada em tampão 0,5x TBE, a uma diferença de potencial de 60 V até o corante azul de bromofenol ter percorrido 2/3 do comprimento do gel. O DNA foi visualizado por fluorescência sob radiação ultravioleta utilizando um transiluminador. O registo da separação electroforética foi analisada no sistema vídeo *Eagle Eye II Still Vídeo System* (Stratagene), utilizando o programa *Eagle Sight 3.2* (Stratagene).

---

**TBE 10x:** 0,89 M Tris; 0,89 M ácido bórico; 20 mM EDTA

**Tampão de aplicação 4x:** 20% (p/v) Ficoll 400; 0,1 M EDTA; 0,25% (p/v) azul de bromofenol

---

#### 2.2.10.5 Sequenciação e análise de sequências de DNA

As reacções de sequenciação foram efectuadas recorrendo aos serviços da *Stabvida* (Portugal), utilizando os iniciadores nucleotídicos descritos na tabela 2.3.

As sequências de DNA obtidas (região ITS e hidrofobina) foram analisadas utilizando o pacote de programas DNASTAR versão 2.58 (Lasergene). Recorrendo ao servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e utilizando o algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1997), foi analisada a homologia das sequências obtidas (e respectivas sequências aminoacídicas deduzidas) com outras sequências presentes na base de dados GenBank.

#### 2.2.11 Tratamento estatístico

Os resultados são apresentados como a média de três a cinco experiências independentes, acompanhados pelo respectivo erro (ep) ou desvio padrão (s).

As diferenças entre médias foram determinadas por análise de variância (ANOVA), usando o programa SAS, versão 9.1., e calculadas pelo teste de Tukey, para probabilidades inferiores a 5% (\*), 1% (\*\*) e 0,1% (\*\*\*) considerando-se, respectivamente, como significativas, muito significativas e altamente significativas.

## **CAPÍTULO 3**

### **Diversidade macrofúngica associada a *Castanea sativa***



### 3.1 INTRODUÇÃO

No Nordeste Transmontano, a cultura do castanheiro (*Castanea sativa* Mill.) tem uma grande importância, económica, social, cultural e paisagística. Esta espécie caracteriza-se por estabelecer associações simbióticas, ao nível radicular, com fungos do solo, resultando na formação de ectomicorrizas. Na sua maioria, estes fungos simbióticos são produtores de estruturas reprodutoras macroscópicas, designando-se assim por macrofungos.

O conhecimento da diversidade de macrofungos associados ao castanheiro, bem como aos diversos ecossistemas agro-florestais da região Transmontana, é muito reduzido. Este desconhecimento é em parte explicado pelo facto da macromicologia não ter tradição em Portugal, o que faz com que a grande maioria dos técnicos com formação nas áreas biológicas não se dediquem ao seu estudo. Por outro lado, as características biológicas específicas inerentes aos fungos (e.g. difícil identificação das estruturas vegetativas, flutuação no aparecimento das estruturas reprodutoras e curta longevidade dos carpóforos), bem como as dificuldades a nível taxonómico, comprometem significativamente a realização de trabalhos que permitam o seu conhecimento. Desse modo, a diversidade de espécies macrofúngicas nos diversos ecossistemas, a sua ocorrência sazonal, o potencial produtivo das espécies com maior valorização gastronómica, o comportamento das diversas espécies aos factores ambientais e as implicações económicas que possam advir da exploração deste recurso natural, são praticamente desconhecidos quer na região Transmontana quer ao nível nacional.

#### 3.1.1 Macrofungos

##### 3.1.1.1 Definição e classificação taxonómica

Os macrofungos são fungos que produzem estruturas reprodutoras macroscópicas, designadas por carpóforos, esporocarpos ou cogumelos, sendo visíveis a olho nu (maiores que 1 mm) (Arnolds, 1992; Kirk *et al.*, 2001). Apesar de se tratar de um grupo artificial, uma vez que abrange um grande número de espécies pertencentes a grupos taxonómicos distintos, esta designação é muito usada pela maior parte dos micólogos.

No reino Fungi têm sido propostos ao longo do tempo vários arranjos ao nível das grandes categorias taxonómicas, nomeadamente das divisões (ou filo), subdivisões e classes. As várias alterações verificadas são fruto da evolução da micologia e dos avanços tecnológicos e científicos noutras ciências, que ao fornecerem novos dados, revelam a necessidade de reconversão dos sistemas, criando-se grupos novos e fragmentando-se ou adaptando-se outros. Segundo Kirk *et al.* (2001), os fungos são classificados em cinco grandes filios (Tabela 3.1). O aspecto geral dos macrofungos incluídos em alguns dos grupos taxonómicos referenciados no texto é apresentado na figura 3.1.

A grande maioria dos macrofungos está incluída nas classes Ascomycetes e Basidiomycetes pertencentes, respectivamente, aos filios Ascomycota e Basidiomycota.

O filo **Ascomycota** é o grupo que engloba a maioria das espécies fúngicas, possuindo cerca de 32 739 espécies (Kirk *et al.*, 2001). Estas caracterizam-se principalmente pela formação de estruturas reprodutoras em forma de saco (asco), no interior dos quais são produzidos os esporos resultantes da meiose (ascósporos). A estrutura vegetativa destes indivíduos consiste em células unicelulares ou filamentos septados, podendo conter cada segmento vários núcleos. Os seus órgãos de frutificação são designados por ascocarpos ou esporocarpos. A maioria dos indivíduos que integram este filo são saprófitas, parasitas (em especial de plantas) e podem ainda estabelecer associações simbióticas com algas microscópicas, formando líquenes (Kirk *et al.*, 2001). Uma grande fracção dos macrofungos que integram o filo Ascomycota, pertencem à classe Ascomycetes, ordem Pezizales e famílias Morchellaceae, Pezizaceae, Helvellaceae, Tuberaceae e Terfeziaceae. Os indivíduos que integram a ordem Pezizales apresentam o corpo de frutificação (ascocarpo) em forma de taça, e designada por apotécio, com o tecido reprodutor (himénio) na superfície interna (Kirk *et al.*, 2001). No caso dos indivíduos com crescimento hipógeo, os ascocarpos apresentam-se fechados, sendo geralmente carnudos, cilíndricos, claviformes ou mais ou menos globosos. As espécies que integram esta ordem podem ser saprófitas, podendo colonizar madeira (lenhícolas), solo (terrícolas) ou húmus (humícolas). As formas hipógeas podem formar micorrizas (Kirk *et al.*, 2001).

O filo **Basidiomycota** integra um número de espécies ligeiramente menor que o filo Ascomycota, compreendendo cerca de 29 914 espécies (Kirk *et al.*, 2001). Os

**Tabela 3.1** Classificação taxonômica dos fungos e da maioria dos macrofungos incluídos no filo Ascomycota (indicado a verde) e Basidiomycota (indicado a azul) (segundo Kirk *et al.*, 2001).

Reino	Filo	Classe	Subclasse	Ordem	Família
		Ascomycetes		Pezizales	Morchellaceae Peizaceae Helvellaceae Tuberaceae Terfeziaceae
	Ascomycota	Neolectomycetes Pneumocystidomycetes Saccharomycetes Schizosaccharomycetes Taphiromycetes			
			Tremellomycetidae	Auriculariales Tremellales	Auriculariaceae Tremellaceae
Fungi					Agaricaceae Bolbitiaceae Clavariaceae Coprinaceae Cortinariaceae Entolomataceae Fistulinaceae Hydangiaceae Lycoperdaceae Marasmiaceae Nidulariaceae Pleurotaceae Pluteaceae Strophariaceae Tricholomatacea
	Basidiomycota	Basidiomycetes	Agaricomycetidae	Agaricales	

Tabela 3.1 Continuação.

Reino	Filo	Classe	Subclasse	Ordem	Família	
Basidiomycota		Basidiomycetes	Agaricomycetidae	Cantharellales	Boletaceae	
					Gomphidiaceae	
					Gyroporaceae	
					Boletales	Hygrophoropsidaceae
					Paxillaceae	
					Rhizopogonaceae	
					Sclerodermatacea	
					Suillaceae	
					Cantharellaceae	
					Clavulinaceae	
Fungi				Phallales	Hydaceae	
					Geastraceae	
					Gomphaceae	
					Phallaceae	
					Ramariaceae	
					Fomitopsidiaceae	
					Polyporales	Ganodermataceae
					Polyporaceae	
					Russulales	Russulaceae
Fungos anamórficos	Chitridiomycota				Urediniomycetes	
					Ustilaginomycetes	
Zigomycota					Trichomycetes	
					Zygomycetes	



**Figura 3.1** Aspecto geral dos carpóforos de diferentes espécies macrofúngicas e dos respectivos esporos que integram as principais famílias das classes Ascomycetes (dentro da caixa verde) e Basidiomycetes (dentro da caixa azul). As famílias pertencentes à mesma ordem encontram-se sombreadas pela mesma cor (adaptado de Courtecuisse & Duhem, 2005; Moreno, 2005).

indivíduos pertencentes a este filo caracterizam-se por apresentarem uma estrutura característica, denominada basídio, onde são produzidos os esporos (basidiósporos) após cariogamia e meiose. Alguns grupos deste filo são também caracterizados por possuírem ansas de anastomose. A presença ou ausência de septos no interior do basídio constitui uma característica importante que permite a separação dos fungos que integram a classe Basidiomycetes (vulgarmente designados de basidiomicetos) em duas subclasses, Tremellomycetidae e Agaricomycetidae. Os indivíduos incluídos na subclasse Tremellomycetidae apresentam basídios septados (com septos transversais ou longitudinais) enquanto que os incluídos na subclasse Agaricomycetidae não apresentam basídios com septos internos (Kirk *et al.*, 2001).

A maioria dos macrofungos que integram a subclasse Tremellomycetidae está incluída nas ordens Auriculariales (família Auriculariaceae), caracterizados por apresentarem os basídios septados transversalmente, e Tremellales (família Tremellaceae), onde os basídios surgem septados longitudinalmente e os fungos são saprófitas-lenhícolas (Courtecuisse & Duhem, 2005).

A subclasse Agaricomycetidae é a mais importante uma vez que inclui as espécies de cogumelos vulgarmente conhecidas, os fungos gasteróides (corpos frutíferos frequentemente com formas globosas, de *gastero*, semelhante a um estômago) e as espécies em forma de “prateleira” que crescem no tronco das árvores. A grande maioria dos macrofungos pertencentes a esta subclasse encontra-se distribuída nas ordens Agaricales, Boletales, Cantharellales, Phallales, Polyporales e Russulales.

Os macrofungos incluídos na ordem Agaricales possuem corpos de frutificação carnudos, divididos geralmente em pé (estipe) e chapéu (píleo), com lâminas na parte inferior (himenófero). Os corpos frutíferos jovens podem encontrar-se cobertos por um véu universal que pode originar, nos exemplares maduros, a presença de uma volva na base do pé. O himénio pode também encontrar-se coberto por um véu parcial, na fase inicial do seu desenvolvimento. Este véu parcial origina frequentemente a presença de uma cortina ou de um anel nos exemplares maduros. Podem ser saprófitas (terrícolas, lenhícolas, ou húmicas), micorrízicos (em especial ectomicorrízicos) e raramente patogénicos (Kirk *et al.*, 2001). O grande número de macrofungos pertencentes a esta ordem encontra-se distribuído pelas famílias Agaricaceae, Bolbitiaceae, Clavariaceae, Coprinaceae, Cortinariaceae, Entolomataceae, Fistulinaceae, Hydnangiaceae,

Lycoperdaceae, Marasmiaceae, Nidulariaceae, Pleurotaceae, Pluteaceae (sin. Amanitaceae), Strophariaceae e Tricholomataceae.

As espécies da ordem Boletales são normalmente estipadas e com himenóforo tubulado (estrutura poróide) facilmente destacável da carne do píleo. São na sua maioria saprófitas terrícolas ou lenhícolas, podendo ser também ectomicorrízicos ou hiperparasitas, os quais crescem sobre outros fungos, sobretudo de espécies ectomicorrízicas integrantes da ordem Boletales (Kirk *et al.*, 2001). Esta ordem compreende, entre outros, os fungos da família Boletaceae, Gomphidiaceae, Gyrosporaceae, Hygrophoropsidaceae, Paxillaceae, Rhizopogonaceae, Sclerodermataceae e Suillaceae.

Os indivíduos da ordem Cantharellales caracterizam-se por possuírem geralmente um pé e um chapéu, com uma forma semelhante a um funil ou então tubulado. O himenóforo é liso, pregueado e enrugado. A maioria é saprófita terrícola ou húmicola (Kirk *et al.*, 2001) e integram as famílias Cantharellaceae, Clavulinaceae e Hydnaceae.

As características morfológicas que permitem a classificação dos indivíduos na ordem Phallales são variáveis de acordo com a família que integram (Kirk *et al.*, 2001). O seu corpo de frutificação apresenta formas muito variáveis desde fálco, estrelado e coralóide (Courtecuisse & Duhem, 2005). A maioria das espécies macrofúngicas que integram esta ordem encontram-se nas famílias Geastraceae, Gomphaceae, Phallaceae e Ramariaceae.

A ordem Polyporales inclui os indivíduos cujos carpóforos têm a forma semelhante a uma prateleira (frequentemente designada por forma afiloforóide) e que crescem no tronco de árvores. Nestes carpóforos o himénio é quase sempre tubular, rígido e não carnudo como nos Agaricales. Ao contrário dos indivíduos que integram a ordem Boletales, o himénio tubulado não se separa com facilidade, por se encontrar inserido na carne do chapéu. No entanto, incluem-se neste grupo muitos *taxa* cujos carpóforos têm estipe e píleo (Courtecuisse & Duhem, 2005). A grande maioria dos macrofungos desta ordem integram as famílias Fomitopsidiaceae, Ganodermataceae e Polyporaceae.

Os macrofungos pertencentes à ordem Russulales caracterizam-se por possuírem corpos de frutificação epígeos, duros ou frágeis, podendo ocorrer exsudação de leite (ou látex) ao toque. Podem ser ectomicorrízicos, saprófitas ou patogénicos (principalmente

de plantas) (Kirk *et al.*, 2001; Courtecuisse & Duhem, 2005). Na sua maioria pertencem à família Russulaceae, nos géneros *Russula* (cujos carpóforos não produzem látex) e *Lactarius* (caracterizados por produzirem látex).

### 3.1.1.2 Nutrição

Os fungos são organismos quimioheterotróficos, sendo a nutrição feita por absorção dos nutrientes solúveis, provenientes do substrato colonizado pelo fungo. Nos casos em que estes nutrientes derivam de polímeros complexos, os fungos secretam enzimas sobre o substrato que colonizam, utilizando as moléculas simples resultantes da degradação enzimática. Este tipo de nutrição regula o modo de crescimento do fungo, uma vez que o seu crescimento ocorre normalmente após a exaustão de nutrientes na zona colonizada (Deacon, 1997).

De acordo com o tipo de estratégia adoptada para a obtenção de alimento, os macrofungos, foram classificados em três grupos funcionais: micorrízicos, saprófitas e parasitas.

Os fungos **micorrízicos** são os que vivem em associação simbiótica com raízes de plantas. No âmbito desta associação, a planta hospedeira recebe nutrientes minerais enquanto o fungo recebe compostos carbonados de origem fotossintética. Os macrofungos formam normalmente ectomicorrizas, associações simbióticas caracterizadas por o fungo se instalar maioritariamente no exterior da raiz (constituindo o manto) e nos espaços intercelulares (constituindo a rede de Hartig) (Smith & Read, 1997). As espécies macrofúngicas com maior valorização, quer ao nível gastronómico quer ao nível económico, pertencem a este grupo trófico. De entre elas destacam-se a trufa branca italiana (*Tuber magnatum* Pico & Vitt.) cujos preços de venda podem variar entre 1500 e 17.500 €/kg, a trufa negra de Périgord (*Tuber melanosporum* Vitt.) com preços na ordem dos 500 a 1.750 €/kg, *Tricholoma matsutake* (Ito & Imai) cotados entre 350 a 1.250 €/kg, *Boletus edulis* Bull., *Cantharellus cibarius* Fr. e *Amanita caesarea* (Scop.) Pers. com preços mais acessíveis (Hall & Yun, 2002; Yun & Hall, 2004). As três últimas espécies surgem com alguma frequência nas plantações de castanheiro no Nordeste Transmontano (Baptista *et al.*, 2003; Baptista *et al.*, 2005) (Baptista *et al.*, 2003; Baptista *et al.*, 2005) e constituem uma das principais espécies

comercializadas localmente, com preços que podem atingir os 10-15 €/kg (Cano, 2002; Garcia *et al.*, 2006).

Os fungos **saprófitas** são os principais decompositores da matéria orgânica morta mineralizando-a, através de sistemas enzimáticos capazes de degradar a matéria orgânica morta, incluindo a lenhina e a celulose da madeira (Courtecuisse & Duhem, 2005). Estes fungos podem ser ainda classificados em fungos lenhícolas, terrícolas, húmícolas, entre outros, consoante o tipo de substrato que colonizam (Castro, 2002). Exemplos comuns de macrofungos decompositores são os que se observam sobre os troncos de madeira em decomposição ou cepos de árvores cortadas (Durrieu, 1993). Algumas destas espécies são muito valorizadas gastronomicamente, sendo as mais conhecidas as espécies que integram o género *Pleurotus*, o “shiitake” (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) e *Stropharia rugosoannulata* Farl. ex Murrill. No caso de fungos que colonizam substratos húmícolas e com grande importância gastronómica, destacam-se as espécies pertencentes ao género *Agaricus*, sendo o mais conhecido o “champignon de Paris” (*Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Pilát) por se encontrar frequentemente à venda nas superfícies comerciais.

Os fungos **parasitas** colonizam hospedeiros vivos, tais como animais, plantas ou fungos, desenvolvendo-se com prejuízo para o hospedeiro (Courtecuisse & Duhem, 2005). A maioria destes macrofungos parasitam plantas, sendo um dos exemplos mais vulgares as espécies pertencentes ao género *Armillaria*. Embora sejam conhecidos casos de macrofungos que parasitam larvas de insectos (por exemplo *Cordyceps militaris* (L.) Link e *Cordyceps subsessilis* Petch), de um modo geral estes fungos não parasitam animais. No entanto, alguns macrofungos parasitas, como por exemplo o *Cordyceps capitata* (Holmsk.) Link, são capazes de parasitar outras espécies macrofúngicas.

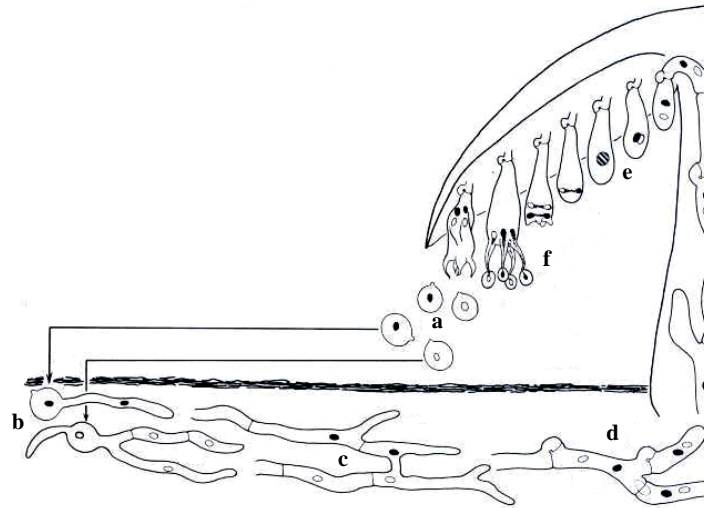
### 3.1.1.3 Ciclo de vida

Quando as condições ambientais são favoráveis ao crescimento do micélio ocorre a germinação dos esporos de macrofungos, sendo por vezes necessário um período de maturação ou de um sinal (térmico ou químico) de activação específico para a ocorrência de germinação (Isaac, 1998). As hifas resultantes ramificam-se continuamente formando uma rede mais ou menos densa de filamentos, designado por micélio primário, monocariótico e com carácter haplóide (Courtecuisse & Duhem,

2005). Em determinadas condições nutricionais e ambientais, que podem ser favoráveis ou desfavoráveis (imposição de um stresse), ocorre o início da reprodução que é frequentemente acompanhado pela paragem do crescimento micelial (Moore, 1998; Courtecuisse & Duhem, 2005).

Nos macrofungos a reprodução pode ser assexuada ou sexuada. Na reprodução assexuada, o micélio primário produz simplesmente esporos, que se podem desenvolver directamente a partir das hifas ou a partir de compartimentos celulares especializados. Na reprodução sexuada (Figura 3.2), verifica-se a união dos protoplasmas das células de dois micélios primários compatíveis (plasmogamia), dando origem a um micélio secundário, dicariótico, cujas células possuem dois núcleos, cada um com *n* cromossomas. Em condições adequadas, em especial de temperatura e de humidade, este micélio dá origem à formação de estruturas macroscópicas, os carpóforos, esporocarpos ou cogumelos, onde ocorre a produção de esporos (Courtecuisse & Duhem, 2005). Este tipo de esporos são formados em células férteis especializadas (ascos ou basídios) localizadas no himénio, após fusão dos núcleos (cariogamia) e meiose. Ao atingirem a maturação os esporos são libertados, através de mecanismos próprios, por gravidade, acção mecânica do vento, da chuva, de animais ou do próprio homem, que após germinação originam um novo micélio primário (Webster, 1980; Courtecuisse & Duhem, 2005).

O crescimento e desenvolvimento destas estruturas macroscópicas compreende duas fases distintas e é geralmente rápido, ocorrendo num intervalo de 5 a 10 dias, dependendo da espécie fúngica. Na primeira fase é formada uma massa de hifas, o primórdio, onde se vão diferenciar as diferentes estruturas constituintes do carpóforo. Esta fase ocorre num intervalo de tempo considerável, podendo compreender alguns dias. Na segunda fase, muito mais rápida, podendo demorar apenas algumas horas, ocorre o alongamento dos compartimentos celulares e, conseqüentemente, o crescimento da frutificação (Jennings & Lysek, 1996).



**Figura 3.2** Ciclo de vida de um macrofungo pertencente ao filo Basidiomycota ilustrando a reprodução sexuada. a - liberação dos esporos; b - germinação dos esporos; c - plasmogamia; d - micélio secundário; e - cariogamia; f - meiose (adaptado de Courtecuisse & Duhem, 2005).

#### 3.1.1.4 Factores que afectam a frutificação

O conhecimento dos diversos factores que influenciam o aparecimento e o desenvolvimento dos carpóforos é, até ao momento, muito reduzido. Tem sido sugerido que os principais sinais para o início do desenvolvimento destas estruturas reprodutoras são a luz, a humidade e a temperatura (Jennings & Lysek, 1996; Moore, 1998). A alternância entre períodos de luz e de escuridão parece ser extremamente importante na indução da formação de carpóforos. A intensidade da luz, o tempo de exposição assim como o comprimento de onda parecem ter igualmente influência no início da esporulação e na morfologia externa do cogumelo (Webster, 1980; Moore, 1998). Os comprimentos de onda mais eficazes na indução da formação dos corpos de frutificação parecem ser aqueles próximos do ultravioleta (320-400 nm) e do azul (400-520 nm) (Moore, 1998).

A temperatura parece influenciar directamente a formação de carpóforos, ao retardarem o crescimento micelial quando os valores são muito baixos, e indirectamente por provocarem uma maior evaporação da água quando os valores são elevados (Azevedo, 1989). Segundo Calonge (1983), a temperatura ideal para o desenvolvimento da maioria das espécies macrofúngicas varia entre 10 e 25°C. No entanto, em algumas espécies, os valores óptimos de temperatura são variáveis consoante o estado de desenvolvimento. Nos estádios iniciais, correspondente ao crescimento micelial e

indução de frutificação, são requeridas temperaturas na ordem dos 24°C; enquanto que nos estádios tardios do desenvolvimento macrofúngico, normalmente correspondente à formação dos carpóforos, as temperaturas devem ser inferiores a 16°C (Moore, 1998).

A humidade do solo ou do substrato parece determinar o momento e o número de frutificações (Lange, 1978; Eveling *et al.*, 1990; Laganà *et al.*, 2002; Salerni *et al.*, 2002). Determinadas espécies, sobretudo as pertencentes aos géneros *Tricholoma*, *Agaricus* e *Boletus*, exigem elevada humidade no solo para a formação dos carpóforos. Pelo contrário, outras espécies, como os fungos xerófilos (por exemplo, espécies da família Nidulariaceae e Lycoperdaceae) têm preferência por substratos com baixo teor de humidade (Azevedo, 1989). Contudo, várias evidências sugerem que a maioria das espécies macrofúngicas requer uma humidade superior a 70% para que ocorra a sua frutificação (Calonge, 1983).

Dado que os três factores principais que afectam a frutificação apresentam flutuações típicas ao longo do ano, as épocas de frutificação dos macrofungos ocorrem geralmente em alturas do ano específicas, nomeadamente na Primavera e no Outono. Outros factores igualmente relevantes para a frutificação dos macrofungos são a estrutura do solo, sua permeabilidade, composição e valores de pH (Webster, 1980; Calonge, 1983). De facto, a maioria dos macrofungos cresce e frutifica bem em lugares ácidos (pH inferior a 6), mas outros precisam de valores mais básicos (pH superior a 7), como é o caso de *Tuber melanosporum*, *Tuber aestivum*, *Amanita ovoidea*, *Lactarius sanguifluus*, *Gyroporus ammophilus* e *Inocybe heimii* (Moldes, 1996). Existem evidências de que a concentração de oxigénio e de dióxido de carbono possam também exercer um efeito sobre o crescimento de micélio, na iniciação dos corpos de frutificação e na sua morfologia externa (diâmetro do chapéu, altura do pé, entre outros) (Moore, 1998). Webster (1980) refere ainda que os microrganismos existentes no solo estimulam a frutificação de algumas espécies macrofúngicas. De entre estes destacam-se algumas espécies de bactérias pertencentes aos géneros *Arthrobacter*, *Bacillus* e *Rhizobium*.

### 3.1.2 Macromicologia em Portugal e na região de Trás-os-Montes

Em Portugal, as herborizações mais antigas remontam ao princípio do século XIX, divulgadas com a publicação da “Flora Lusitana II” (1804) da autoria de Avelar

Brotero, onde são descritas 54 espécies de “cogumelos” pertencentes a 16 géneros (Winter, 1884; Anónimo, 1999). Nesta altura, entendiam-se como “cogumelos” todos os fungos e não apenas os macrofungos.

Em 1855 surgiu uma nova publicação, da autoria de Berkeley, onde são descritas 74 espécies, 13 das quais referenciadas como sendo novas (Winter, 1884). Contudo, foi somente no final do século XIX, que começou a haver uma sequenciação das primeiras contribuições para o conhecimento da flora micológica portuguesa. Muitas dessas contribuições resultaram do trabalho de botânicos que adicionavam, aos seus levantamentos da flora vascular, dados sobre algumas espécies de fungos. O Barão de Thuemen juntamente com Von Niessl e Winter (1878), foram provavelmente os primeiros a dar início a esta catalogação, pela publicação das suas notas e registos de centenas de espécies de “cogumelos” ocorrentes, sobretudo, nos arredores de Coimbra (Winter, 1884). Durante um vasto período de tempo, Júlio Henriques (1881), Bresadola (1891), Torrend (1902), Pereira Coutinho (1903) e muitos outros foram constituindo novas listas e alargando o conhecimento da diversidade dos fungos portugueses (Anónimo, 1999). Neste âmbito destacam-se os trabalhos publicados por Pereira Coutinho, em 1931 e 1934, intitulados “Basidiomicetas Novos Para a Flora de Portugal” (Azevedo, 1989). Também no início do século XX, Sousa da Câmara teve um contributo importante na micologia portuguesa, pela elaboração do catálogo dos basidiomicetos portugueses, intitulado “Catálogo Fungorum Lusitânico” e editado em 1956 e 1958, onde compilou e listou todas as espécies herborizadas e identificadas em Portugal até 1945.

Em 1950, Mendes contribuiu significativamente para o conhecimento da família Agaricaceae em Portugal, ao apresentar uma lista de 21 espécies registadas e acompanhada de uma breve descrição de três espécies consideradas novas em Portugal. Também Dennis (1956) fez um registo de 85 espécies de macrofungos, dos quais 45 eram agaricoides (Anónimo, 1999). Depois desta data, os registos publicados foram muito escassos, sendo de referir apenas o registo de 100 espécies na região da Estremadura (Anónimo, 1999). Apesar da existência de alguns registos não publicados entre 1968 e 1988, que fazem parte do Herbário dos Serviços Florestais da Estação Agronómica de Oeiras, apenas com a criação no Centro de Micologia da Universidade de Lisboa foram recomeçadas as herborizações sistemáticas e inventariação do material colectado. De entre os trabalhos então desenvolvidos destacam-se publicações sobre a

ocorrência de espécies macrofúngicas (Pinho-Almeida, 1991; Pinho-Almeida & Baptista Ferreira, 1992; Pinho-Almeida & Baptista Ferreira, 1994; Pinho-Almeida & Baptista Ferreira, 1997) e os diversos estudos de índole taxonómica e sistemática de fungos Aphylophorales e agaricóides (Pinho-Almeida, 1991; Pinho-Almeida, 1992). Em 1999, o Centro de Micologia da Universidade de Lisboa produziu um documento, onde é feita a listagem preliminar de fungos agaricóides (ordens Agaricales, Russulales e Boletales) em Portugal, supostamente identificados entre os anos 1878 e 1997 (Anónimo, 1999). Este é o documento mais actualizado a nível da compilação das espécies nacionais.

Na região de Trás-os-Montes, a maioria dos trabalhos de inventariação de espécies macrofúngicas realizados tem sido efectuada essencialmente por orientação de grupos de investigadores da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (Azevedo, 1989; Menezes, 1990; Barbosa, 1994; Borges, 1998) e da Escola Superior Agrária de Bragança (Meireles, 1997; Barrote, 1998), sendo publicados sob a forma de estágios de Bacharelato ou Licenciatura. Algumas associações micológicas existentes na região têm tido igualmente um contributo importante neste domínio, destacando-se a “Associação Micológica a Pantorra” pela publicação anual de listagens de espécies macrofúngicas (nos “Anais da Associação Micológica a Pantorra”, desde 2001); e o Parque Natural de Montesinho pela elaboração de uma listagem preliminar de espécies de macrofungos que ocorrem em dois *habitats* existentes na referida área protegida (Branco, 2003). Estes estudos referem-se, maioritariamente, a registos esporádicos da ocorrência de espécies macrofúngicas sendo desconhecidos trabalhos sistemáticos de inventariação a longo prazo na região transmontana.

### **3.1.3 Espécies macrofúngicas associadas a soutos e castiçais em Trás-os-Montes**

Os trabalhos referidos de inventariação de espécies macrofúngicas associadas a plantações de castanheiro, localizadas na região de Trás-os-Montes para produção de fruto (souto) ou de madeira (castiçal), foram efectuados durante a época de Outono de 1987 (Azevedo, 1989; Menezes, 1990), Outono e Primavera de 1988 (Azevedo, 1989), Outono de 1996 (Meireles, 1997) e Primavera de 1998 (Borges, 1998). As amostragens foram realizadas em várias localidades do concelho de Bragança, Vinhais, Torre de Moncorvo, Macedo de Cavaleiros, Vila Real e Vila Pouca de Aguiar. Os resultados

revelam que os povoamentos de castanheiro, na região transmontana, apresentam elevada diversidade macrofúngica. Foi identificado um total de 172 espécies, pertencentes a 32 famílias e a 52 géneros (Tabela 3.2, Anexo I). As famílias mais representativas pertencem à ordem Agaricales, incluindo as Tricholomataceae (com 7 géneros diferentes), Cortinariaceae (com 5 géneros) e Lycoperdaceae e Marasmiaceae (cada uma com 3 géneros). Os géneros mais representados são os que incluem macrofungos ectomicorrízicos, dos quais se destacam os géneros *Russula* com 20 espécies, *Cortinarius* com 18 espécies, *Lactarius* com 13 espécies, *Tricholoma* com 12 espécies, *Amanita* e *Boletus* cada um com 10 espécies. Os resultados evidenciam ainda que a maioria das espécies macrofúngicas associadas aos povoamentos de castanheiro na região transmontana são ectomicorrízicas, perfazendo cerca de 67% do total inventariado. Muitas das espécies registadas apresentam elevada valorização gastronómica, sendo inclusivamente algumas delas comercializadas nos mercados nacionais e internacionais. De entre estas destacam-se *Amanita caesarea* (Scop.) Pers., *Boletus edulis* Bull., *Cantharellus cibarius* Fr. e *C. cinereus* Pers., *Tricholoma portentosum* (Fr.) Quél. e *Hydnum repandum* L. (Cano, 2002; Garcia *et al.*, 2006).

**Tabela 3.2** Macrofungos identificados em povoamentos de *Castanea sativa* Mill. na região de Trás-os-Montes. Compilação dos resultados obtidos por Azevedo (1989), Menezes (1990), Meireles (1997) e Borges (1998).

Família	Género	Nº espécies
Agaricaceae	<i>Macrolepiota</i>	1
Astraeaceae	<i>Astraeus</i>	1
Auriculariaceae	<i>Auricularia</i>	1
Bolbitiaceae	<i>Agrocybe</i>	1
	<i>Hebeloma</i>	3
Boletaceae	<i>Boletus</i>	10
	<i>Xerocomus</i>	2
Cantharellaceae	<i>Cantharellus</i>	4
Clavulinaceae	<i>Clavulina</i>	1
Cortinariaceae	<i>Cortinarius</i>	18
	<i>Crepidotus</i>	2
	<i>Flammulaster</i>	2
	<i>Inocybe</i>	2
Entolomataceae	<i>Phaeomarasmius</i>	1
	<i>Clitopilus</i>	1
	<i>Entoloma</i>	5
Fistulinaceae	<i>Fistulina</i>	1
Fomitopsidaceae	<i>Postia</i>	1

**Tabela 3.2** Continuação.

<b>Família</b>	<b>Género</b>	<b>Nº espécies</b>
Ganodermataceae	<i>Ganoderma</i>	1
Helvellaceae	<i>Helvella</i>	2
Hydnaceae	<i>Hydnum</i>	2
Hydnangiaceae	<i>Laccaria</i>	4
Hygrophoraceae	<i>Hygrophorus</i>	4
Hygrophoropsidaceae	<i>Hygrophoropsis</i>	1
Leotiaceae	<i>Leotia</i>	1
	<i>Bovista</i>	1
Lycoperdaceae	<i>Lycoperdon</i>	4
	<i>Vascellum</i>	1
	<i>Armillaria</i>	1
Marasmiaceae	<i>Marasmius</i>	3
	<i>Oudemansiella</i>	1
Nidulariaceae	<i>Crucibulum</i>	1
Paxillaceae	<i>Paxillus</i>	1
Pezizaceae	<i>Peziza</i>	1
Physaraceae	<i>Leocarpus</i>	1
Pluteaceae	<i>Amanita</i>	10
Pyronemataceae	<i>Humaria</i>	1
Ramariaceae	<i>Ramaria</i>	1
	<i>Lactarius</i>	13
Russulaceae	<i>Russula</i>	20
Rustroemiaceae	<i>Rustroemia</i>	1
	<i>Pisolithus</i>	1
Sclerodermataceae	<i>Scleroderma</i>	2
	<i>Hypholoma</i>	1
Strophariaceae	<i>Psilocybe</i>	1
	<i>Clitocybe</i>	8
	<i>Collybia</i>	6
	<i>Lepista</i>	1
Tricholomataceae	<i>Mycena</i>	5
	<i>Myxomphalia</i>	1
	<i>Pseudoclitocybe</i>	1
	<i>Tricholoma</i>	12

### 3.1.4 Importância dos macrofungos

Os macrofungos são componentes essenciais dos ecossistemas agro-florestais, desempenhando um papel ecológico importante através das relações simbióticas, saprofiticas e parasíticas, que estabelecem com outras espécies. No caso dos macrofungos ectomicorrízicos, a mobilização de nutrientes, quer através da exploração de maiores volumes de solo, quer através da utilização de formas não disponíveis para os sistemas radiculares das plantas, contribui para a redução ou mesmo a dispensa de

aplicação de fertilizantes (Smith & Read, 1997). Estes fungos, juntamente com outros organismos do solo, afectam ainda a formação e as características estruturais do solo, acelerando a decomposição de minerais (Rillig & Mummey, 2006). O papel ecológico dos fungos saprófitas reflecte-se ao nível da decomposição de substratos e reciclagem de nutrientes, contribuindo para um aumento do volume de nutrientes minerais no solo. Os macrofungos possuem ainda interesse ecológico ao intervirem nas cadeias tróficas como alimento de alguns animais (micofagia).

Para além do seu papel ecológico, os macrofungos contribuem significativamente para a economia de uma região, dado que muitas das espécies macrofúngicas comestíveis possuem um valor económico bastante elevado. As espécies mais apreciadas a nível mundial são normalmente ectomicorrízicas e constituem as mais valorizadas devido, sobretudo, à dificuldade da sua obtenção por cultura (Hall & Yun, 2002). Os valores transaccionados com a colheita e comercialização de cogumelos micorrízicos é de tal maneira elevada que pode exceder os dois biliões de euros por ano no mercado mundial (Hall & Yun, 2002). Curiosamente, algumas das espécies macrofúngicas micorrízicas com mercados bem estabelecidos têm ocorrência em plantações de castanheiro na região transmontana (Baptista *et al.*, 2003; Baptista *et al.*, 2005). Assim sendo, a comercialização de cogumelos silvestres comestíveis, em regiões economicamente desfavorecidas, como é o caso do nordeste transmontano, poderá constituir um recurso natural com grandes possibilidades de gerar recursos alternativos à economia agrária.

A elevada procura de cogumelos comestíveis deve-se essencialmente às propriedades nutricionais, organolépticas e farmacológicas que apresentam. Os cogumelos são alimentos de alto valor nutritivo (Sadler, 2003), possuindo elevado teor em proteínas, vitaminas (pertencentes sobretudo ao complexo B), minerais e compostos aromáticos (Manzi *et al.*, 2001; Mattila *et al.*, 2001; Manzi *et al.*, 2004). Frequentemente é um produto indicado para dietas de emagrecimento, devido ao seu baixo teor em hidratos de carbono e de lípidos (Vetter, 2003). Trabalhos recentes, alguns dos quais realizados com espécies colhidas na região transmontana, evidenciaram propriedades antioxidantes e antimicrobianas dos cogumelos (Mau *et al.*, 2004; Cheung & Cheung, 2005; Lo & Cheung, 2005; Ribeiro *et al.*, 2006; Barros *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2007), podendo ainda ser utilizados para baixar o colesterol, inibir o desenvolvimento de tumores e funcionar como imunomoduladores (Borchers *et al.*,

1999; Zhang *et al.*, 2001; Sadler, 2003; Borchers *et al.*, 2004). De entre a multiplicidade de espécies macrofúngicas com aplicação medicinal destacam-se *Lactarius deliciosus* (L.) Gray, *Lactarius sanguifluus* (Paulet) Fr., *Marasmius oreades* (Bolton) Fr. e *Lepista nuda* (Bull.) Cooke pelas suas propriedades antibacterianas; e as espécies com actividades anticancerígenas *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, actualmente comercializado em preparações farmacêuticas, *Trametes versicolor* (L.) Lloyd, *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer, *Fomes fomentarius* (L.) J.J. Kickx, *B. edulis* Bull., *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm., *P. ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., entre outras (Moreno, 2005).

Adicionalmente, os macrofungos possuem um interesse social, recreativo, educativo e estético, resultante da organização de saídas de campo devidamente guiadas para a divulgação e conhecimento generalizado das diferentes espécies de cogumelos silvestres. Estas actividades poderão fomentar o designado "micoturismo", que incentivará as pessoas da cidade a deslocarem-se até ao campo, onde encontram uma boa gastronomia, diversão e sossego, tendo como consequência a dinamização das populações rurais.

### 3.1.5 Objectivos

O conhecimento da diversidade macrofúngica associada a uma das principais culturas na região transmontana, o castanheiro, é relativamente reduzido. Os poucos trabalhos realizados neste âmbito tiveram um carácter esporádico, com inventariações efectuadas em intervalos de tempo curtos (máximo um ano).

Neste trabalho pretendeu-se contribuir para o conhecimento da flora micológica (riqueza e abundância de espécies) associada ao castanheiro no nordeste transmontano, e analisar a sua ocorrência ao longo de 4 anos (de 2002 até 2005). Pretendeu-se ainda avaliar a produção total de macrofungos e a influência do clima, em especial da temperatura e da precipitação, na riqueza e abundância de espécies macrofúngicas.

A informação obtida possibilitará seleccionar duas espécies macrofúngicas, que vulgarmente se encontram associadas a esta cultura, que serão utilizadas nos trabalhos que se seguem (estudos de antagonismo e de interacção com plântulas de castanheiro). Adicionalmente, esta informação poderá contribuir para o conhecimento micológico associado ao castanheiro, e para a aplicação de medidas concretas de conservação, bem

como para uma melhor gestão deste património natural, que poderão passar pela elaboração de listas vermelhas ou a criação de legislação que regule a colheita de cogumelos silvestres. Este conhecimento poderá também ter repercussões ao nível da população local, demonstrando que são possíveis de obter rendimentos adicionais à exploração do castanheiro pelo aproveitamento sustentado de cogumelos comestíveis.

## 3.2 RESULTADOS

### 3.2.1 Caracterização dos solos do souto estudado

Os solos colhidos nas cinco parcelas amostradas na plantação de *C. sativa* possuíam valores médios de matéria orgânica e de azoto (Tabela 3.3). Os valores de pH (H<sub>2</sub>O e KCl) obtidos classificam os solos como sendo ácidos. Enquanto que os teores de fósforo assimilável são considerados muito baixos, o potássio assimilável apresentou valores muito elevados.

**Tabela 3.3** Resultados das análises dos solos das parcelas amostradas na plantação de *Castanea sativa* estudada neste trabalho.

Parâmetros analisados	Média ± s	
% Matéria Orgânica (M.O.)	3,27 ± 0,01	
pH	H <sub>2</sub> O	5,3 ± 0,12
	KCl	4,6 ± 0,10
Azoto (N em %)	0,152 ± 0,07	
Fósforo (ppm de P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	8 ± 3,21	
Potássio (ppm de K <sub>2</sub> O)	320 ± 24,06	

### 3.2.2 Diversidade da comunidade macrofúngica associada a *Castanea sativa*

Nas cinco parcelas instaladas na plantação de *C. sativa* foi efectuada a colheita de cogumelos desde Setembro de 2002 até Dezembro de 2005, procedendo-se à recolha de características no local de colheita e em laboratório para a sua identificação (Figuras 3.3 e 3.4).

A diversidade da comunidade macrofúngica associada à plantação de *C. sativa*, para cada um dos anos estudados e para o total dos quatro anos, foi avaliada ao nível da sua riqueza (número de espécies) e abundância. A abundância foi avaliada pela análise do número de indivíduos colhidos por espécie, e pela percentagem correspondente a cada espécie relativamente ao total de exemplares colhidos (abundância relativa).

#### *Riqueza de espécies macrofúngicas*

Durante a realização do presente trabalho identificaram-se 73 espécies de



**Figura 3.3** Cogumelos de algumas das espécies macrofúngicas, associadas à plantação de *Castanea sativa*, identificadas no decurso deste trabalho. As imagens foram obtidas no local de colheita, não se reportando a nenhuma época/ano específica.



**Figura 3.4** Cogumelos de algumas das espécies macrofúngicas, associadas à plantação de *Castanea sativa*, identificadas no decurso deste trabalho. As imagens foram obtidas em laboratório aquando do registo de características para a sua identificação.

macrofungos, pertencentes a 16 famílias e 23 géneros (Tabela 3.4). Alguns dos exemplares recolhidos (16 no total) foram identificadas somente até ao género, verificando-se que se distribuíam sobretudo pelos, *Russula*, *Lactarius* e *Tricholoma* cuja identificação é complexa.

De entre as famílias mais representadas, referem-se a Russulaceae, com 19 espécies, Cortinariaceae com 14 espécies, Tricholomataceae com 13 espécies, Boletaceae com 7 espécies e Pluteaceae com 5 espécies (Tabela 3.4). Os géneros mais representados foram *Russula* com 12 espécies, *Inocybe* com 9 espécies, *Lactarius* com 7 espécies, *Tricholoma* com 6 espécies e finalmente com 5 espécies os géneros *Boletus*, *Cortinarius* e *Amanita*. Quanto aos grupos tróficos surge uma clara dominância das espécies micorrízicas que perfazem 82% do total das espécies fúngicas inventariadas, em relação ao grupo de espécies saprófitas (15%) e ao grupo de saprófitas e/ou parasitas (3%). Do total das espécies identificadas (56 espécies), 63% são comestíveis.

A análise dos resultados revela ainda diferenças apreciáveis relativamente ao número de espécies inventariadas, nos diferentes anos de amostragem (Tabela 3.4). Foi durante o ano de 2002 que se registou um maior número de espécies macrofúngicas (56 espécies) das quais 50 eram micorrízicas, 4 saprófitas e 2 saprófitas e/ou parasitas. No total de 20 géneros identificados neste ano, os mais representados foram *Russula* com 11 espécies, *Inocybe*, *Tricholoma* e *Lactarius* cada um com 6 espécies, e por fim *Boletus*, *Cortinarius* e *Amanita* cada um com 4 espécies. No ano de 2003, o número de espécies decresceu, tendo-se inventariado um total de 43 espécies (35 micorrízicas, 7 saprófitas e 1 saprófita e/ou parasita) pertencentes a 19 géneros. Os géneros mais representativos foram *Russula* com 8 espécies, *Inocybe* com 6 espécies, *Cortinarius* com 5 espécies e por fim *Lactarius* e *Tricholoma* cada um com 3 espécies. No ano de 2004 foi inventariado um total de 25 espécies (21 micorrízicas, 3 saprófitas e 1 saprófita e/ou parasita), pertencentes a 12 géneros, sendo os mais representados *Russula* com 7 espécies e *Cortinarius* e *Inocybe*, cada um com 3 espécies. O menor número de espécies macrofúngicas inventariado ocorreu durante o ano de 2005, onde se observaram apenas 12 espécies (5 micorrízicas, 6 saprófitas e 1 saprófita e/ou parasita), pertencentes a 9 géneros, sendo os mais representados *Collybia*, *Macrolepiota* e *Russula*, cada um com 2 espécies.

**Tabela 3.4** Abundância (Nº) e percentagem (%) relativa ao total inventariado das espécies macrofúngicas, associadas à plantação de *Castanea sativa*, identificadas anualmente no período 2002 a 2005. A comestibilidade (Comest.) e o grupo trófico (Trofia) a que pertencem são igualmente apresentados.

Comest	Trofia	Família, género e espécies	2002		2003		2004		2005		Total	
			Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
		<b>Agaricaceae</b>										
		<i>Macrolepiota</i>										
C	s	<i>M. mastoidea</i> (Fr.) Singer	0	0,00	6	0,40	0	0,00	1	0,72	7	0,26
C	s	<i>M. procera</i> (Scop.) Singer	1	0,12	1	0,07	0	0,00	2	1,45	4	0,15
		<b>Bolbitiaceae</b>										
		<i>Hebeloma</i>										
NC	m	<i>H. crustuliniforme</i> (Bull.) Quéf.	33	4,05	255	16,84	20	9,48	0	0,00	308	11,54
D	m	<i>Hebeloma</i> sp.1	4	0,49	0	0,00	0	0,00	0	0,00	4	0,15
		<b>Boletaceae</b>										
		<i>Boletus</i>										
C	m	<i>B. aereus</i> Bull.	4	0,49	0	0,00	1	0,47	0	0,00	5	0,19
C	m	<i>B. edulis</i> Bull.	17	2,09	4	0,26	0	0,00	0	0,00	21	0,78
NC	m	<i>B. rhodoxanthus</i> (Krombh.) Kall.	0	0,00	4	0,26	0	0,00	0	0,00	4	0,15
NC	m	<i>B. satanoides</i> Smotl.	1	0,12	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,04
D	m	<i>Boletus</i> sp.1	3	0,37	0	0,00	0	0,00	0	0,00	3	0,11
		<i>Xerocomus</i>										
C	m	<i>X. chrysenteron</i> (Bull.) Quéf.	21	2,58	4	0,26	0	0,00	1	0,72	26	0,97
D	m	<i>Xerocomus</i> sp.1	1	0,12	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,04
		<b>Cantharellaceae</b>										
		<i>Cantharellus</i>										
C	m	<i>C. cibarius</i> Fr.	3	0,37	0	0,00	93	44,08	24	17,39	120	4,48
C	m	<i>C. melanoxeros</i> Desm.	0	0,00	2	0,13	0	0,00	0	0,00	2	0,07
		<b>Cortinariaceae</b>										
		<i>Cortinarius</i>										
NC	m	<i>C. anomalus</i> (Fr.) Fr.	19	2,33	15	0,99	0	0,00	0	0,00	34	1,27
NC	m	<i>C. diasemospermus</i> Lamoure	0	0,00	6	0,40	0	0,00	0	0,00	6	0,22
NC	m	<i>C. helobius</i> Romagn.	47	5,77	116	7,66	4	1,90	0	0,00	167	6,24
NC	m	<i>C. hinnuleus</i> Fr.	6	0,74	11	0,73	3	1,42	0	0,00	20	0,75
D	m	<i>Cortinarius</i> sp.3	13	1,60	6	0,40	1	0,47	0	0,00	20	0,75

Tabela 3.4 Continuação.

Comest	Trofia	Família, gênero e espécies	2002		2003		2004		2005		Total	
			Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
		<i>Inocybe</i>										
NC	m	<i>I. asterospora</i> Quéél.	5	0,61	0	0,00	0	0,00	0	0,00	5	0,19
NC	m	<i>I. flocculosa</i> (Berk.) Sacc.	13	1,60	110	7,27	8	3,79	0	0,00	131	4,89
NC	m	<i>I. geophylla</i> (Pers.) P. Kumm.	47	5,77	216	14,27	40	18,96	0	0,00	303	11,32
NC	m	<i>I. rimosa</i> (Bull. Fr.) P. Kumm.	90	11,06	53	3,50	0	0,00	0	0,00	143	5,34
D	m	<i>Inocybe</i> sp.14	0	0,00	0	0,00	7	3,32	25	18,12	32	1,20
		<b>Entolomataceae</b>										
		<i>Clitopilus</i>										
C	m	<i>C. prunulus</i> (Scop.) Fr.	9	1,11	4	0,26	0	0,00	0	0,00	13	0,49
		<b>Fistulinaceae</b>										
		<i>Fistulina</i>										
C	s (p?)	<i>F. hepatica</i> (Schaeff.) With.	1	0,12	0	0,00	1	0,47	2	1,45	4	0,15
		<b>Gyroporaceae</b>										
		<i>Gyroporus</i>										
C	m	<i>G. castaneus</i> (Bull.) Quéél.	2	0,25	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,07
		<b>Hydnaceae</b>										
		<i>Hydnum</i>										
C	m	<i>H. rufescens</i> Pers.	22	2,70	31	2,05	0	0,00	0	0,00	53	1,98
		<b>Hydnangiaceae</b>										
		<i>Laccaria</i>										
C	m	<i>L. amethystina</i> Cooke	5	0,61	3	0,20	0	0,00	0	0,00	8	0,30
C	m	<i>L. laccata</i> (Scop.) Fr.	114	14,00	210	13,87	0	0,00	0	0,00	324	12,10
		<b>Leotiaceae</b>										
		<i>Leotia</i>										
C	s	<i>L. lubrica</i> (Scop.) Pers.	0	0,00	38	2,51	0	0,00	0	0,00	38	1,42
		<b>Lycoperdaceae</b>										
		<i>Lycoperdon</i>										
C	s	<i>L. perlatum</i> Pers.	5	0,61	22	1,45	1	0,47	5	3,62	33	1,23

Tabela 3,4 Continuação.

Comest	Trofia	Família, gênero e espécies	2002		2003		2004		2005		Total	
			Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<b>Pluteaceae</b>												
<i>Amanita</i>												
C	m	<i>A. caesarea</i> (Scop.) Pers.	0	0,00	0	0,00	1	0,47	0	0,00	1	0,04
C	m	<i>A. gemmata</i> (Fr.) Bertill.	9	1,11	0	0,00	0	0,00	0	0,00	9	0,34
NC	m	<i>A. pantherina</i> Gonn. & Rabenh.	1	0,12	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,04
C	m	<i>A. spissa</i> (Fr.) P. Kumm.	1	0,12	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,04
C	m	<i>A. vaginata</i> (Bull.) Lam.	18	2,21	0	0,00	0	0,00	0	0,00	18	0,67
<b>Russulaceae</b>												
<i>Lactarius</i>												
C	m	<i>L. chrysorrhoeus</i> Fr.	4	0,49	0	0,00	0	0,00	0	0,00	4	0,15
C	m	<i>L. piperatus</i> (L.) Pers.	28	3,44	10	0,66	3	1,42	0	0,00	41	1,53
C	m	<i>L. vellereus</i> (Fr.) Fr.	0	0,00	18	1,19	0	0,00	0	0,00	18	0,67
C	m	<i>L. volemus</i> (Fr.) Fr.	2	0,25	1	0,07	1	0,47	0	0,00	4	0,15
D	m	<i>Lactarius</i> sp.1	3	0,37	0	0,00	0	0,00	0	0,00	3	0,11
D	m	<i>Lactarius</i> sp.3	3	0,37	0	0,00	0	0,00	0	0,00	3	0,11
D	m	<i>Lactarius</i> sp.4	4	0,49	0	0,00	0	0,00	0	0,00	4	0,15
<i>Russula</i>												
NC	m	<i>R. amoenolens</i> Romagn.	16	1,97	1	0,07	0	0,00	0	0,00	17	0,64
NC	m	<i>R. chloroides</i> (Krombh.) Bres.	1	0,12	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,04
C	m	<i>R. cyanoxantha</i> (Schaeff.) Fr.	1	0,12	2	0,13	2	0,95	4	2,90	9	0,34
C	m	<i>R. delicata</i> Fr.	23	2,83	12	0,79	1	0,47	0	0,00	36	1,34
NC	m	<i>R. foetens</i> Pers.	27	3,32	1	0,07	4	1,90	0	0,00	32	1,20
C	m	<i>R. lutea</i> Vent.	16	1,97	59	3,90	1	0,47	2	1,45	78	2,91
C	m	<i>R. nigricans</i> (Bull.) Fr.	3	0,37	0	0,00	0	0,00	0	0,00	3	0,11
C	m	<i>R. odorata</i> Romagn.	21	2,58	16	1,06	0	0,00	0	0,00	37	1,38
C	m	<i>R. risigallina</i> (Batsch) Sacc.	14	1,72	9	0,59	5	2,37	0	0,00	28	1,05
D	m	<i>Russula</i> sp.1	13	1,60	9	0,59	1	0,47	0	0,00	23	0,86
D	m	<i>Russula</i> sp.3	1	0,12	3	0,20	0	0,00	0	0,00	4	0,15
D	m	<i>Russula</i> sp.11	0	0,00	0	0,00	6	2,84	0	0,00	6	0,22

Tabela 3.4 Continuação.

Comest	Trofia	Família, gênero e espécies	2002		2003		2004		2005		Total	
			Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<b>Strophariaceae</b>												
		<i>Hypholoma</i>										
NC	s (p?)	<i>H. fasciculare</i> (Huds.) Quél.	5	0,61	16	1,06	0	0,00	0	0,00	21	0,78
<b>Tricholomataceae</b>												
		<i>Calocybe</i>										
C	s	<i>C. gambosa</i> (Fr.) Donk	0	0,00	11	0,73	0	0,00	0	0,00	11	0,41
		<i>Clitocybe</i>										
C	s	<i>C. gibba</i> (Pers.) P. Kumm.	1	0,12	0	0,00	1	0,47	0	0,00	2	0,07
D	s	<i>Clitocybe</i> sp.2	0	0,00	0	0,00	2	0,95	0	0,00	2	0,07
		<i>Collybia</i>										
C	s	<i>C. butyracea</i> (Bull.) Fr.	0	0,00	7	0,46	0	0,00	0	0,00	7	0,26
C	s	<i>C. dryophila</i> (Bull.) P. Kumm.	1	0,12	0	0,00	0	0,00	62	44,93	63	2,35
NC	s	<i>C. marasmioides</i> (Britzelm.) Bresinsky & Stangl	0	0,00	7	0,46	0	0,00	3	2,17	10	0,37
		<i>Mycena</i>										
D	s	<i>Mycena</i> sp.1	0	0,00	0	0,00	0	0,00	7	5,07	7	0,26
		<i>Tricholoma</i>										
C	m	<i>T. acerbum</i> (Bull.) Vent.	23	2,83	60	3,96	2	0,95	0	0,00	85	3,18
C	m	<i>T. ustale</i> (Fr.) P. Kumm.	6	0,74	105	6,94	2	0,95	0	0,00	113	4,22
C	m	<i>T. ustaloides</i> Romagn.	0	0,00	6	0,40	0	0,00	0	0,00	6	0,22
D	m	<i>Tricholoma</i> sp.1	5	0,61	0	0,00	0	0,00	0	0,00	5	0,19
D	m	<i>Tricholoma</i> sp.2	2	0,25	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,07
D	m	<i>Tricholoma</i> sp.3	5	0,61	0	0,00	0	0,00	0	0,00	5	0,19
		<b>Total</b>	814	100,0	1514	100,0	211	100,0	138	100,0	2677	100,0

Legenda: C – comestível; NC – não comestível; D – desconhecido; m – micorrizico; s – saprófita; p – parasita.

### ***Abundância de espécies macrofúngicas***

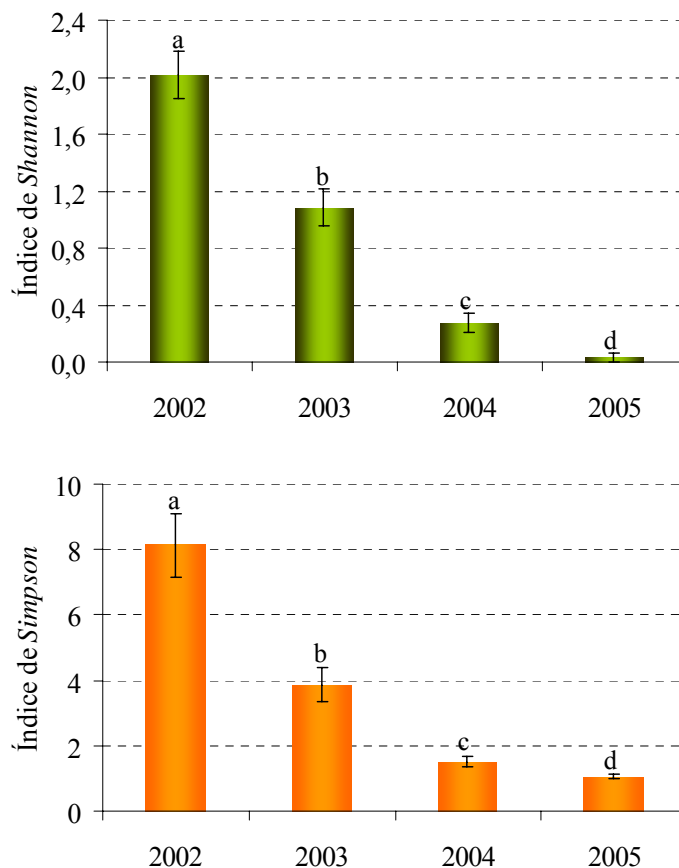
No período considerado para o estudo (2002-2005), as espécies com maior número de carpóforos colhidos foram *Laccaria laccata*, *Hebeloma crustuliniforme* e *Inocybe geophylla* compreendendo 12,1%, 11,5% e 11,3%, respectivamente, dos 2677 exemplares observados (Tabela 3.4). Outras espécies de abundância relativa elevada foram *Cortinarius helobius* (6,24%), *Inocybe rimosa* (5,3%), *Inocybe flocculosa* (4,9%), *Cantharellus cibarius* (4,5%) e *Tricholoma ustale* (4,2%).

A abundância relativa das espécies macrofúngicas identificadas variou nos diferentes anos de amostragem (Tabela 3.4). Em 2002, *L. laccata* foi a espécie mais abundante representando 14,0% dos 814 exemplares colhidos. As espécies *I. rimosa* (11,1%), *I. glabripes* (8,4%), *C. helobius* (5,8%) e *I. geophylla* (5,8%) e *H. crustuliniforme* (4,1%) apresentaram ainda alguma abundância relativa face ao total de espécies colhidas nesse ano. No ano de 2003, a espécie que surgiu em maior quantidade foi *H. crustuliniforme*, representando 16,8% dos 1514 carpóforos colhidos. Outras espécies que apresentaram alguma abundância relativa nesse ano foram *I. geophylla* (14,3%), *L. laccata* (13,9%), *C. helobius* (7,7%), *I. flocculosa* (7,3%) e *T. ustale* (6,9%). No ano de 2004 registou-se uma alteração drástica ao nível do padrão de abundância das espécies, onde a espécie *Cantharellus cibarius* surgiu como sendo a mais abundante, representando 44,1% dos 211 carpóforos colhidos. No entanto, e à semelhança do verificado nos anos anteriores (2002 e 2003), as espécies *I. geophylla* e *H. crustuliniforme* surgiram igualmente com relativa abundância representando, respectivamente, cerca de 19,0% e 9,5% do total dos carpóforos colhidos durante o ano de 2004. Ao contrário do verificado nos anos anteriores, no ano de 2005 verificou-se ser uma espécie saprófita, *Collybia dryophila*, a espécie mais abundante, correspondendo a 44,9% dos 138 carpóforos colhidos. As espécies *I. rimosa* e *C. cibarius* tiveram igualmente uma expressão relativa representando, respectivamente, 18,1% e 17,4% do total dos exemplares colhidos.

### **3.2.3 Índices de diversidade**

A riqueza observada no número de espécies macrofúngicas, identificadas nos vários anos estudados, foi avaliada em função do índice de diversidade alfa, utilizando-se os índices de *Shannon-Wiener* ( $H'$ ) e de *Simpson* ( $D$ ) (Figura 3.5). O índice de

*Simpson* traduz a abundância das espécies mais comuns, sendo, consequentemente, mais sensível a mudanças que ocorrem nestas espécies. Quanto maior o seu valor, maior a dominância de uma ou poucas espécies, sendo mais reduzida a diversidade de espécies. O índice de *Shannon-Wiener*, também designado como índice de *Shannon*, fundamenta-se no postulado que, numa amostra aleatória retirada de uma população infinitamente grande, todas as espécies da comunidade se encontram representadas (Southwood & Henderson, 2000). Apesar desta premissa ser dificilmente cumprida,  $H'$  é um dos índices mais usados. De facto, se a amostra contiver a maioria das espécies existentes que poderiam ser recolhidas, o erro resultante na determinação de  $H'$  não é grande. O erro torna-se significativo se existirem muitas espécies representadas apenas por um ou dois indivíduos não sendo, por isso, recolhidas na amostra.  $H'$  toma o valor de zero quando todos os indivíduos pertencem à mesma espécie.



**Figura 3.5** Índices de diversidade de *Shannon-Wiener* e de *Simpson* das espécies macrofúngicas registadas durante a realização deste trabalho (2002-2005). Valores com letra diferente diferem significativamente entre si para  $p < 0,05$ .

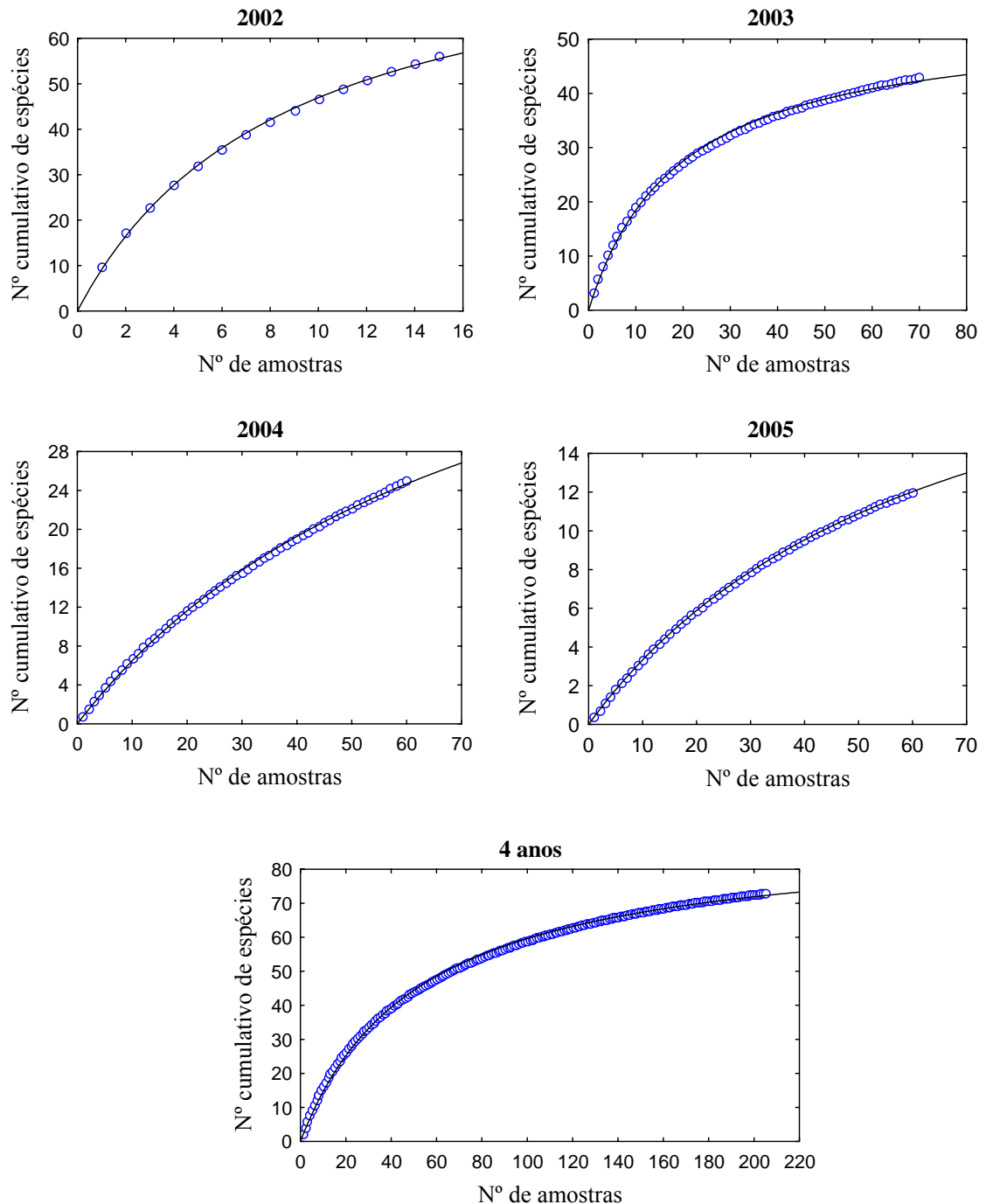
Os valores dos índices de *Shannon* e de *Simpson* referentes a cada um dos anos estudados diferem significativamente entre si (Figura 3.5). A diversidade do número de espécies macrofúngicas, traduzida por qualquer um dos índices estudados, foi significativamente superior no ano de 2002 (valor de índice de *Shannon* igual a  $2,0 \pm 0,17$  e de *Simpson* igual a  $8,1 \pm 0,98$ ) comparativamente aos dos outros anos. A riqueza de espécies macrofúngicas foi decrescendo nos anos subsequentes, atingindo-se os menores valores de índice de *Shannon* ( $0,03 \pm 0,03$ ) e de *Simpson* ( $1,1 \pm 0,06$ ) em 2005.

### 3.2.4 Estimativa da diversidade através de curvas cumulativas de espécies

A aproximação do número de espécies macrofúngicas registadas durante o estudo com o número de espécies previsivelmente existente, foi inferida mediante a elaboração de curvas cumulativas de espécies registadas (Soberón & Llorente, 1993). Quando o número de espécies recolhidas se aproxima do número previsível (número teórico) para um dado *habitat* (ou área de estudo), a curva atinge a assíntota. Caso contrário, é necessário que se efectuem mais dias de observação e/ou colheita (maior esforço amostral) de modo a que a amostragem efectuada traduza a diversidade real de espécies macrofúngicas no *habitat* estudado.

As curvas cumulativas de espécies foram efectuadas para cada um dos anos amostrados e para o conjunto dos quatro anos (Figura 3.6). A análise da curva cumulativa respeitante ao ano de 2002 indica que um maior esforço amostral deveria ter sido realizado. De acordo com o modelo, deveriam ter sido recolhidas 87 espécies macrofúngicas para haver uma aproximação ao número previsivelmente existente, tendo sido apenas recolhidas 56 espécies, o que corresponde a 64% do total de espécies previstas. Em 2003, das 54 espécies macrofúngicas que deveriam ter sido identificadas, foram recolhidas 43, correspondentes a 80% do número total de espécies previstas. Nos últimos dois anos do estudo, o número de espécies identificadas não ultrapassou os 50% do número de espécies a considerar para traduzir a diversidade real da área de estudo. Em 2004 foram recolhidas 25 espécies macrofúngicas, correspondendo a 44% do número total de espécies previsto (56 espécies) e em 2005 foram recolhidas apenas 12 das 25 espécies macrofúngicas previstas, correspondendo somente a 48% do número total de espécies macrofúngicas que deveriam existir nesse ano. Considerando os quatro anos de estudo, a análise da curva cumulativa de espécies macrofúngicas indica uma

amostragem de cerca de 80,5% da população macrofúngica que previsivelmente existiria na área de estudo (foi registado um total de 73 espécies, e a previsão seria de 91 espécies).

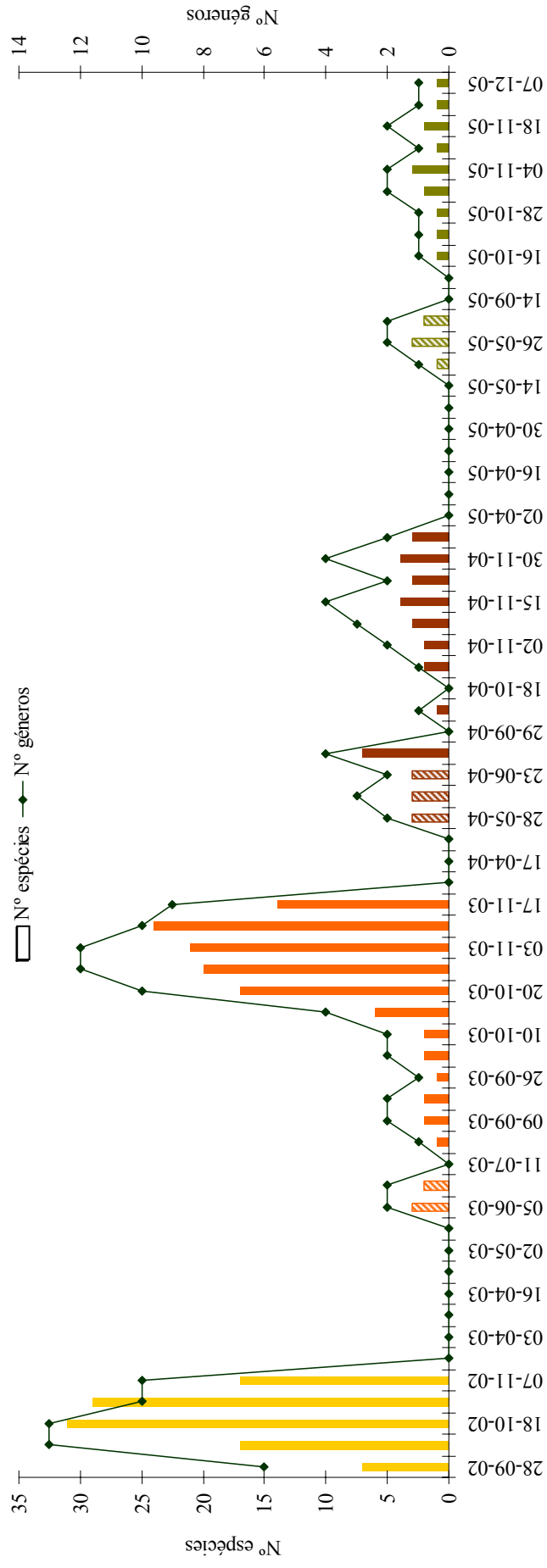


**Figura 3.6** Curvas cumulativas de espécies macrofúngicas registadas no ano de 2002 (56 espécies, 15 amostras), 2003 (43 espécies, 70 amostras), 2004 (25 espécies, 60 amostras), 2005 (12 espécies, 60 amostras) e no total dos quatro anos (73 espécies, 205 amostras).

### **3.2.5 Fenologia de frutificação e de abundância de espécies macrofúngicas**

A fenologia de frutificação de macrofungos associados à plantação de castanheiros em Trás-os-Montes decorreu no período de Setembro de 2002 a Dezembro de 2005. Neste estudo são evidenciadas duas épocas de frutificação, uma no Outono e outra na Primavera (Figura 3.7). A época de frutificação mais intensa ocorre no Outono, entre os meses de Setembro e Novembro. A frutificação que ocorre na Primavera tem menor expressão, ocorrendo entre finais de Maio e durante Junho. Os resultados obtidos evidenciam ainda diferenças do número de espécies e de géneros macrofúngicos colhidos em cada época, durante todo o período do estudo. Este aspecto é particularmente evidente na época de frutificação do Outono, onde se registaram valores superiores no Outono de 2002 e 2003 face aos restantes anos (2004 e 2005). Pelo contrário, o número de espécies e de géneros colhidos na época de frutificação da Primavera foram muito similares em todos os anos estudados (2003, 2004, 2005).

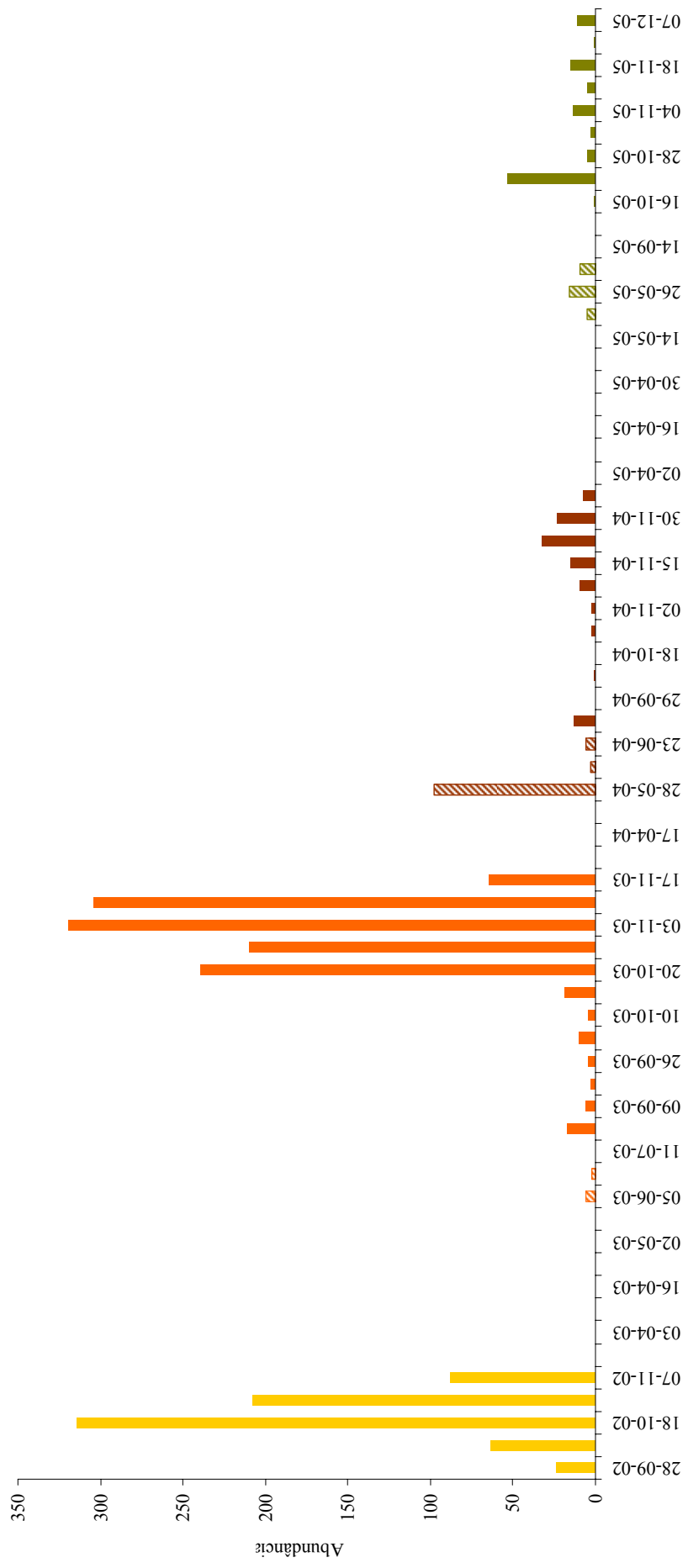
A fenologia de frutificação de macrofungos variou no decurso das diferentes épocas de frutificação, durante todo o período de estudo (Figura 3.7). Em 2002, a época de frutificação de Outono descreve claramente uma curva normal, entre o final de Setembro e meados de Novembro, com um máximo sensivelmente a meio do mês de Outubro, altura em que foram encontradas 31 espécies numa única saída efectuada no dia 18. A época de frutificação da Primavera de 2003 foi muito curta, ocorrendo de 5 a 10 de Junho, não tendo sido encontrada qualquer espécie nas saídas efectuadas durante os meses de Abril, Maio e Julho. O número máximo de espécies registado por saída durante esta época de frutificação foi de 3 espécies no dia 5 de Junho. A época de frutificação de Outono de 2003 foi, pelo contrário, mais intensa e com uma fenologia muito similar à observada em 2002, descrevendo uma curva normal com início em Setembro e final a meio de Novembro. O número máximo de espécies recolhidas por dia (24) foi registado a 10 de Novembro. Em 2004, a época de frutificação da Primavera foi mais alargada que a do ano anterior, com início a 28 de Maio e final a 23 de Junho, não tendo sido registada a presença de espécies em Abril. Em cada uma das saídas efectuadas nesta época de frutificação foram recolhidas apenas três espécies. A época de frutificação de Outono de 2004, ao contrário do observado para os anos anteriores, não descreve uma curva normal, tendo-se registado o valor máximo de número de espécies por saída (7) logo no início da época de frutificação, a 14 de Setembro. A partir desta



**Figura 3.7** Número de espécies e de gêneros de macrofungos colhidos nas diferentes datas de amostragem, durante os quatro anos de estudo (período de Setembro de 2002 a Dezembro de 2005). As amostragens de cada ano estão assinaladas por cores diferente (amarelo - 2002, laranja - 2003, castanho - 2004 e verde - 2005), sendo feita a distinção entre a época de frutificação de Outono (coluna preenchida) e de Primavera (coluna a tracejado).

data e até ao dia 25 de Outubro, praticamente não foram encontradas espécies macrofúngicas, altura a partir da qual o número total de espécies registado por saída foi praticamente constante (2 a 4 espécies) até ao final da época de frutificação (9 de Dezembro). No último ano estudado, a época de frutificação da Primavera teve início a 20 de Maio e terminou a 3 de Junho, com três espécies como máximo registado a 26 de Maio. À semelhança do observado para a época de frutificação de Outono de 2004, a fenologia de frutificação no Outono de 2005 não descreve a típica curva normal, uma vez que o número máximo de espécies registado por saída durante este período, com início a 16 de Outubro e final a 7 de Dezembro, foi praticamente constante.

A abundância das diferentes espécies macrofúngicas, expressa pelo número de carpóforos, revela a existência de diferenças apreciáveis entre as várias saídas efectuadas ao longo do trabalho (Figura 3.8). Foi em 2002 e 2003 que se registou um maior número de carpóforos, correspondendo a cerca de 57% e 30% do total dos exemplares colhidos (2677), respectivamente. O número de carpóforos recolhidos em 2004 e 2005 foi substancialmente inferior, representando respectivamente 8% e 5% do total dos exemplares recolhidos. A análise global dos resultados revela ainda diferenças entre épocas de frutificação, sendo possível verificar uma maior abundância de carpóforos durante o Outono comparativamente à Primavera, para todos os anos em estudo, com excepção de 2004. No Outono de 2002, a partir de 28 de Setembro, verificou-se um aumento do número de carpóforos por saída, com o valor máximo a ser atingido (404 carpóforos) a 18 de Outubro. A partir desta data o número de carpóforos decresceu, não se observando a ocorrência de qualquer exemplar a 7 de Dezembro. Em 2003, foram recolhidos 8 carpóforos durante a época de frutificação da Primavera, com um máximo (6 carpóforos) a 5 de Junho. Na época de frutificação do Outono, do mesmo ano, foram colhidos 1506 exemplares. Nesta época, o número de carpóforos registados por saída manteve-se praticamente constante durante Setembro e início de Outubro, altura a partir da qual aumentaram apreciavelmente, colhendo-se um máximo de 376 exemplares numa única saída efectuada a 10 de Novembro. Ao contrário dos anos anteriores, em 2004, foi observado um número de carpóforos ligeiramente superior na Primavera comparativamente ao Outono, colhendo-se respectivamente 107 e 104 exemplares. O maior número de carpóforos colhidos na época de frutificação da Primavera deveu-se sobretudo à colheita de 28 de Maio, onde se registaram 98

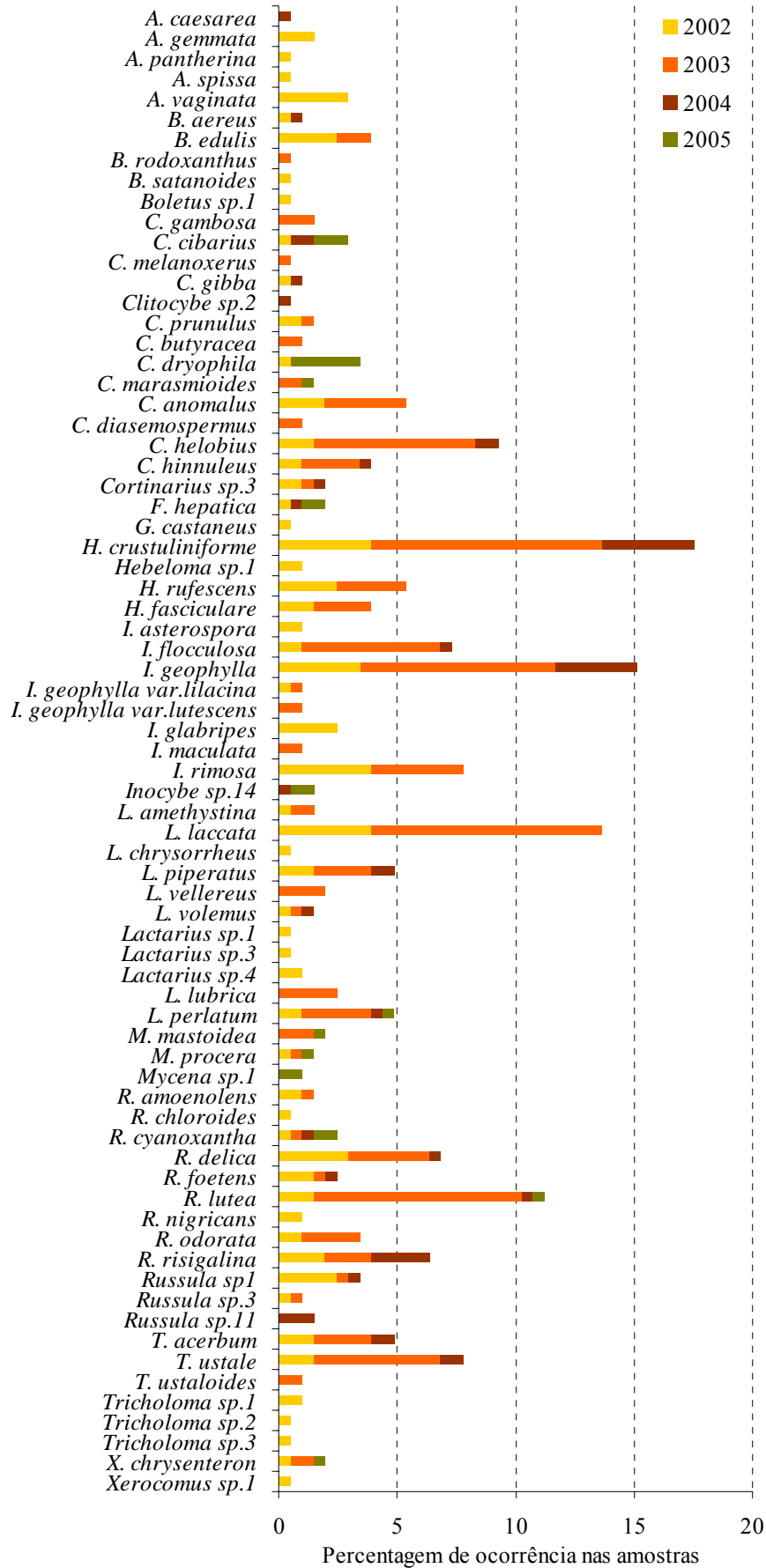


**Figura 3.8** Abundância (Nº de carpóforos) das diferentes espécies macrofúngicas colhidas nas várias datas de amostragem, durante os quatro anos de estudo (período de Setembro de 2002 a Dezembro de 2005). As amostragens de cada ano estão assinaladas por cores diferentes (amarelo - 2002, laranja - 2003, castanho - 2004 e verde - 2005), sendo feita a distinção entre a época de frutificação de Outono (coluna preenchida) e de Primavera (coluna a tracejado).

exemplares. Na época de frutificação do Outono, o número de carpóforos colhidos por saída (média de 4 carpóforos) foi constante nos meses de Setembro, Outubro e início de Novembro. A partir desta data, o número de carpóforos por saída aumentou, registando-se o valor máximo de 32 exemplares no dia 25 de Novembro. Em 2005 observou-se uma menor abundância de carpóforos, com um total de 30 e 108 exemplares colhidos durante a época de frutificação da Primavera e do Outono, respectivamente. Na Primavera, o maior número de exemplares (16 carpóforos) registado por saída foi efectuada a 26 de Maio. No Outono, o valor máximo registado foi de 53 exemplares a 21 de Outubro. A partir desta data o número de carpóforos foi praticamente constante até ao início de Dezembro, altura a partir da qual não se registou a presença de qualquer exemplar.

### 3.2.6 Frequência de ocorrência das espécies macrofúngicas

A frequência de ocorrência (em percentagem) das diferentes espécies macrofúngicas, durante todo o período estudado (Setembro de 2002 a Dezembro de 2005), foi analisada através da contabilização do número de dias em que a espécie foi observada face ao número total de dias em que ocorreram as saídas de campo (Figura 3.9). Esta análise revelou que a espécie *H. crustuliniforme* foi a mais frequente, estando presente em 17,6% do total das amostras recolhidas nos quatro anos. Esta espécie surgiu em 3,9% das amostras recolhidas quer em 2002 quer em 2004 e 9,8% em 2003. *I. geophylla* foi a segunda espécie mais frequente, tendo sido observada em 15,1% das amostras recolhidas durante os quatro anos, verificando-se igualmente maior frequência no ano de 2003 (8,0%) do que nos anos de 2002 e 2004 (3,4%). As espécies *L. laccata*, *R. lutea* e *C. helobius* surgiram, igualmente, com relativa frequência face às restantes espécies macrofúngicas. A espécie *L. laccata*, que constituiu a terceira espécie mais frequente, foi observada em 13,7% das amostras analisadas nos quatro anos, sendo a sua presença especialmente notória durante 2003 (presente em 9,8% das amostras examinadas). A sua ocorrência foi inferior em 2002, tendo surgido apenas em 3,9% das amostras, e não se detectou a sua presença em 2004. *R. lutea*, a quarta espécie mais frequente, foi uma das poucas espécies presentes em todos os anos que decorreu o estudo (2002-2005), estando presente em 11,2% das amostras totais. Quer em 2004 quer



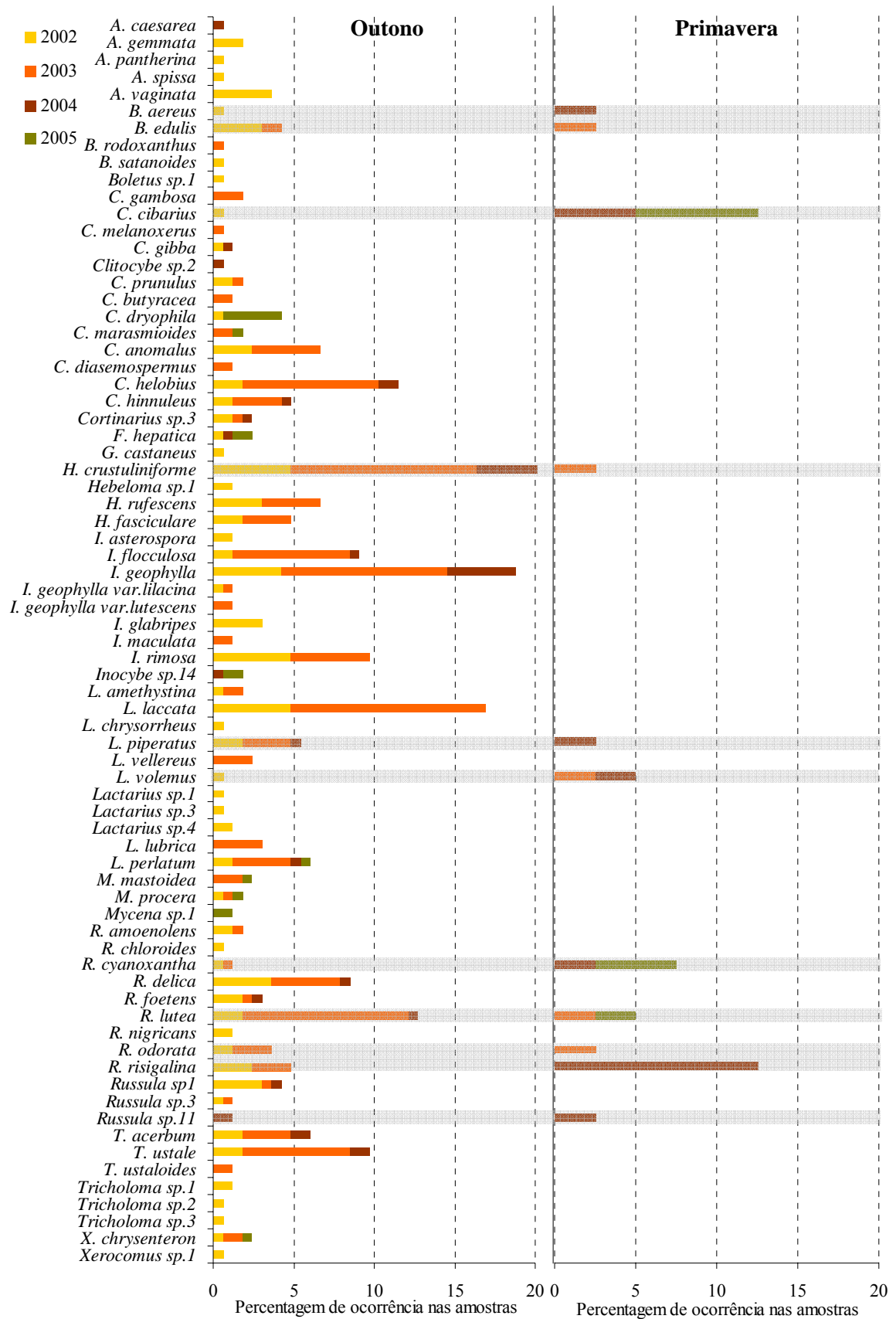
**Figura 3.9** Frequência de ocorrência (em porcentagem) das diferentes espécies macrofúngicas recolhidas durante os quatro anos estudados [2002 (n = 15), 2003 (n = 70), 2004 (n = 60) e 2005 (n = 60)].

em 2005, esta espécie apareceu em 0,5% das amostras, em 2002 em 1,5% das amostras e finalmente em 2003 em 8,8% das amostras. *C. helobius* foi a quinta espécie mais frequente, com presença em 9,3% das amostras examinadas nos quatro anos. Surgiu em 2002, 2003 e 2004, respectivamente em 1,5%, 7,0% e 1,0% das amostras observadas.

A frequência de ocorrência das diferentes espécies macrofúngicas, nos quatro anos, revela ainda que a maioria das espécies inventariadas apresentou uma ocorrência variável ao longo dos anos (Figura 3.9). Para a maior parte das espécies registadas, verificou-se uma maior frequência nas amostras examinadas durante 2003 do que nas dos restantes anos estudados. Este aspecto é sobretudo notório para as espécies pertencentes à família Cortinariaceae, tais como *C. anomalus*, *C. helobius*, *C. hinnuleus*, *I. flocculosa* e *I. geophylla*, e ainda para as espécies *H. crustuliniforme*, *L. laccata*, *L. perlatum*, *R. lutea* e *T. ustale*. Adicionalmente, verificou-se que muitas das espécies registadas (34) ocorreram somente num dos anos estudados, correspondendo a um total de 46% das espécies inventariadas. Foram registadas 20 espécies com ocorrência única em 2002, 10 espécies em 2003, três espécies em 2004 e uma espécie em 2005. Cerca de 50% das espécies inventariadas surgiram somente em dois (25%) ou em três (25%) dos anos estudados. Somente 4% do total de espécies macrofúngicas inventariadas é que apresentou ocorrência constante durante os quatro anos, tal como é o caso de *L. perlatum*, *R. lutea* e *R. cyanoxantha*.

A comparação da frequência de ocorrência das diferentes espécies macrofúngicas na época de frutificação de Outono e Primavera, considerando todo o período de estudo (2002-2005), revela que a maioria das espécies inventariadas (85% do número total) foi apenas registada na época de Outono (Figura 3.10). Somente onze espécies apareceram em ambas as estações, Primavera e Outono, pertencendo sobretudo aos géneros *Russula* (*R. cyanoxantha*, *R. lutea*, *R. odorata*, *R. risigalina* e *Russula* sp.11), *Lactarius* (*L. piperatus* e *L. volemus*) e *Boletus* (*B. aereus* e *B. edulis*).

Na época de frutificação do Outono, a espécie mais frequente foi *H. crustuliniforme*, que esteve presente em 21,2% das amostras recolhidas no Outono no total dos quatro anos (Figura 3.10). Esta espécie esteve presente em 4,8% das amostras recolhidas quer no Outono de 2002 quer no de 2004, e em 11,5% no de 2003. A segunda e terceira espécie mais frequente foram *I. geophylla* e *L. laccata*, que



**Figura 3.10** Frequência de ocorrência (em percentagem) das diferentes espécies macrofúngicas recolhidas durante os quatro anos estudados durante o período de frutificação de Outono e de Primavera. [Época de frutificação de Outono: 2002 (n = 15), 2003 (n = 60), 2004 (n = 45), 2005 (n = 45); época de frutificação da Primavera: 2003 (n = 10), 2004 (n = 15) e 2005 (n = 15)].

estiveram presentes em, respectivamente, 18,8% e 17,0% no total das amostras observadas nos quatro anos na época do Outono. *R. lutea* e *C. helobius* foram a quarta e quinta espécies mais frequentes, estando presentes em 12,7% e 11,5%, respectivamente, do total das amostras observadas no Outono para os quatro anos de estudo.

No que concerne à época de Primavera, verifica-se elevada frequência de duas espécies macrofúngicas, *R. risigalina* e *C. cibarius*, cada uma presente em 12,5% das amostras totais examinadas (Figura 3.10). Enquanto que *R. risigalina* surgiu somente num dos anos estudados (2004), *C. cibarius* esteve presente em 5% das amostras recolhidas em 2004 e em 7,5% das amostras de 2005. *R. cyanoxantha* foi a terceira espécie mais frequente, surgindo em 7,5% das amostras recolhidas nos quatro anos (presente em 2,5% das amostras de 2004 e 5,0% nas de 2005). A quarta espécie mais frequente na época de Primavera foi *L. volemus*, sendo identificada em 5,0% das amostras totais examinadas com uma frequência de ocorrência idêntica (2,5%) nos anos de 2003 e 2004.

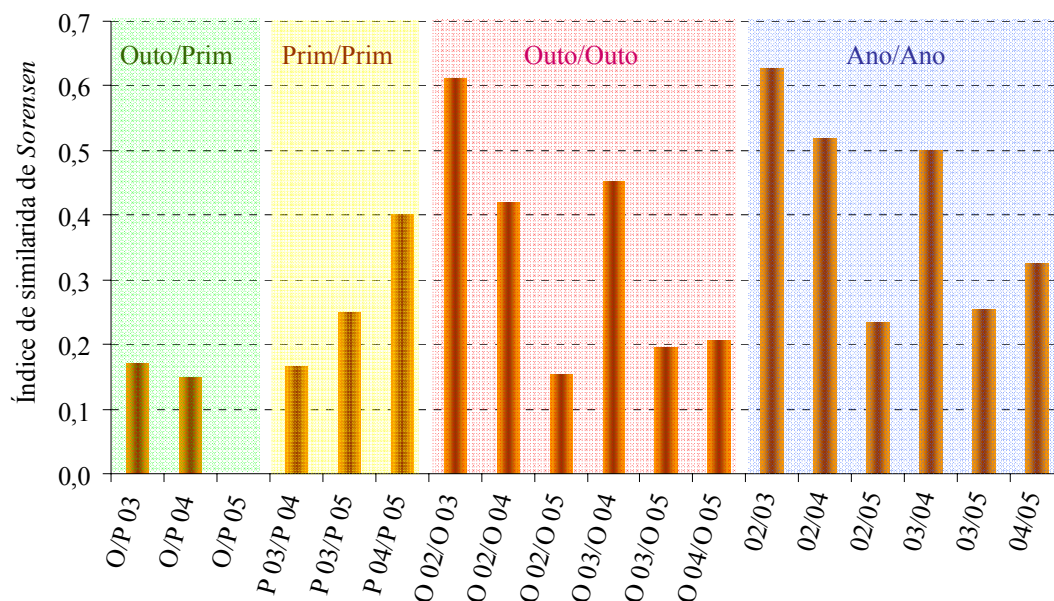
A maioria das espécies macrofúngicas (6 espécies) com ocorrência em ambas as estações, aparecem com maior frequência na época de frutificação da Primavera relativamente à do Outono (Figura 3.10). Este aspecto é sobretudo notório para as espécies *C. cibarius*, *B. aereus* e *L. volemus*, cujas frequências de ocorrência foram marcadamente superiores na época da frutificação da Primavera (12,5%, 2,5% e 5,0%, respectivamente) comparativamente à de Outono (0,6%). *R. cyanoxantha* e *R. risigalina* apresentaram igualmente maior frequência na época da Primavera (7,5% e 12,5%) do que na época de Outono (1,2% e 4,8% das amostras, respectivamente). De salientar que as espécies que surgem em ambas as épocas de frutificação podem não ter sido identificadas no mesmo ano. Este aspecto foi verificado para *B. aereus*, *R. risigalina*, *R. cyanoxantha*, *L. volemus* e *C. cibarius*.

### 3.2.7 Índice de similaridade de *Sorensen*

A análise de similaridade do número de espécies macrofúngicas, que foram recolhidas nas diferentes épocas de frutificação (Outono e Primavera) e nos diferentes anos de estudo, foi efectuada mediante o cálculo do índice de *Sorensen* (Figura 3.11). Em todos os anos estudados verificou-se que o número de espécies comuns entre a época de frutificação da Primavera e do Outono era muito reduzido, apresentando

índices de similaridade de *Sorensen* na ordem dos 0,17 e 0,15 para os anos de 2003 e 2004, respectivamente. Em 2005, o índice de *Sorensen* foi nulo, significando que neste ano nenhuma das espécies recolhidas na época de frutificação da Primavera era coincidente com espécies recolhidas na época de Outono.

Índices de similaridade reduzidos foram igualmente observados entre as diferentes épocas de frutificação de Primavera, à excepção da comparação realizada entre as Primaveras de 2004 e 2005, no qual se registou um valor de índice de *Sorensen* igual a 0,4 (Figura 3.11). Entre as diferentes épocas de frutificação de Outono verificou-se uma maior similaridade nas espécies registadas em 2002 e 2003, apresentando um índice de *Sorensen* superior a 0,6. Pelo contrário, somente uma pequena fracção das espécies macrofúngicas que surgiram na época de frutificação de Outono de 2002 teve ocorrência na mesma época de 2005 (índice de *Sorensen* igual a 0,15).



**Figura 3.11** Índice de similaridade de *Sorensen* das espécies macrofúngicas registadas em diferentes alturas do período em análise (2002-2005). A comparação entre as épocas de frutificação de Outono e da Primavera referentes a 2003, 2004 e 2005 encontra-se sombreada a verde. A comparação entre as diferentes épocas de frutificação da Primavera (ou Outono) encontra-se sombreada a amarelo (ou a rosa). A comparação entre os diferentes anos encontra-se sombreada a azul. Legenda: O – Outono, P – Primavera, 02 – 2002, 03 – 2003, 04 – 2004, 05 – 2005.

O maior índice de similaridade de *Sorensen* (0,63) foi determinado após comparação das espécies registadas no ano de 2002 e de 2003, sendo igualmente

verificada uma similaridade apreciável entre os anos de 2002 e 2004, e ainda entre 2003 e 2004 (índices de *Sorensen* superior ou igual a 0,5, respectivamente) (Figura 3.11). Pelo contrário, a maioria das espécies recolhidas durante 2002 foram diferentes das registadas em 2005 (índice de *Sorensen* igual 0,24).

### 3.2.8 Produção total de macrofungos

A produção total das diferentes espécies macrofúngicas colhidas em plantações de castanheiro, durante os anos em análise, encontra-se representada na figura 3.12. A colheita de todas as espécies macrofúngicas, realizada durante este período, correspondeu a uma produção total de 67,6 kg de peso seco por hectare. Do total das espécies inventariadas, a espécie *L. piperatus* foi a maior produtora, com um total de 11,0 kg de peso seco por hectare ao fim dos quatro anos (8,2 kg/ha em 2002, 2,6 kg/ha em 2003 e 0,3 kg/ha em 2004). A segunda e terceira espécie mais produtora foram, respectivamente, *R. delica*, com 8,0 kg de peso seco por hectare (7,1 kg/ha em 2002, 0,7 kg/ha em 2003 e 0,1 kg/ha em 2004), e *B. edulis*, com 6,2 kg de peso seco por hectare (5,6 kg/ha em 2002 e 0,6 kg/ha em 2003). As espécies *I. rimosa*, *T. acerbum*, *L. vellereus* e *X. chrysenteron* tiveram igualmente um contributo importante na produção total, produzindo cada uma delas um total de 3,9, 3,6, 2,8 e 2,6 kg de peso seco por hectare, respectivamente.

A produção total de macrofungos obtida nas saídas efectuadas durante o presente trabalho revela a existência de diferenças apreciáveis entre os anos analisados (Figura 3.13). Em 2002 observou-se uma maior produção tendo-se registado 44,0 kg de peso seco por hectare. A produção decresceu substancialmente nos anos subsequentes, registando-se produções totais de 17,1, 4,3 e 2,3 kg de peso seco por hectare, em 2003, 2004 e 2005, respectivamente.

Os resultados evidenciam igualmente uma diferença significativa na produção entre as duas épocas de frutificação (Figura 3.13). À excepção do ano de 2004, foi sempre verificada uma maior produção de macrofungos durante a época de Outono do que na época da Primavera. Na época de frutificação de Outono de 2002, o valor de maior produção foi registado na saída efectuada a 18 de Outubro (20,7 kg de peso seco por hectare), na de 2003 foi em 20 de Outubro (3,4 kg/ha), na de 2004 foi em 14 de

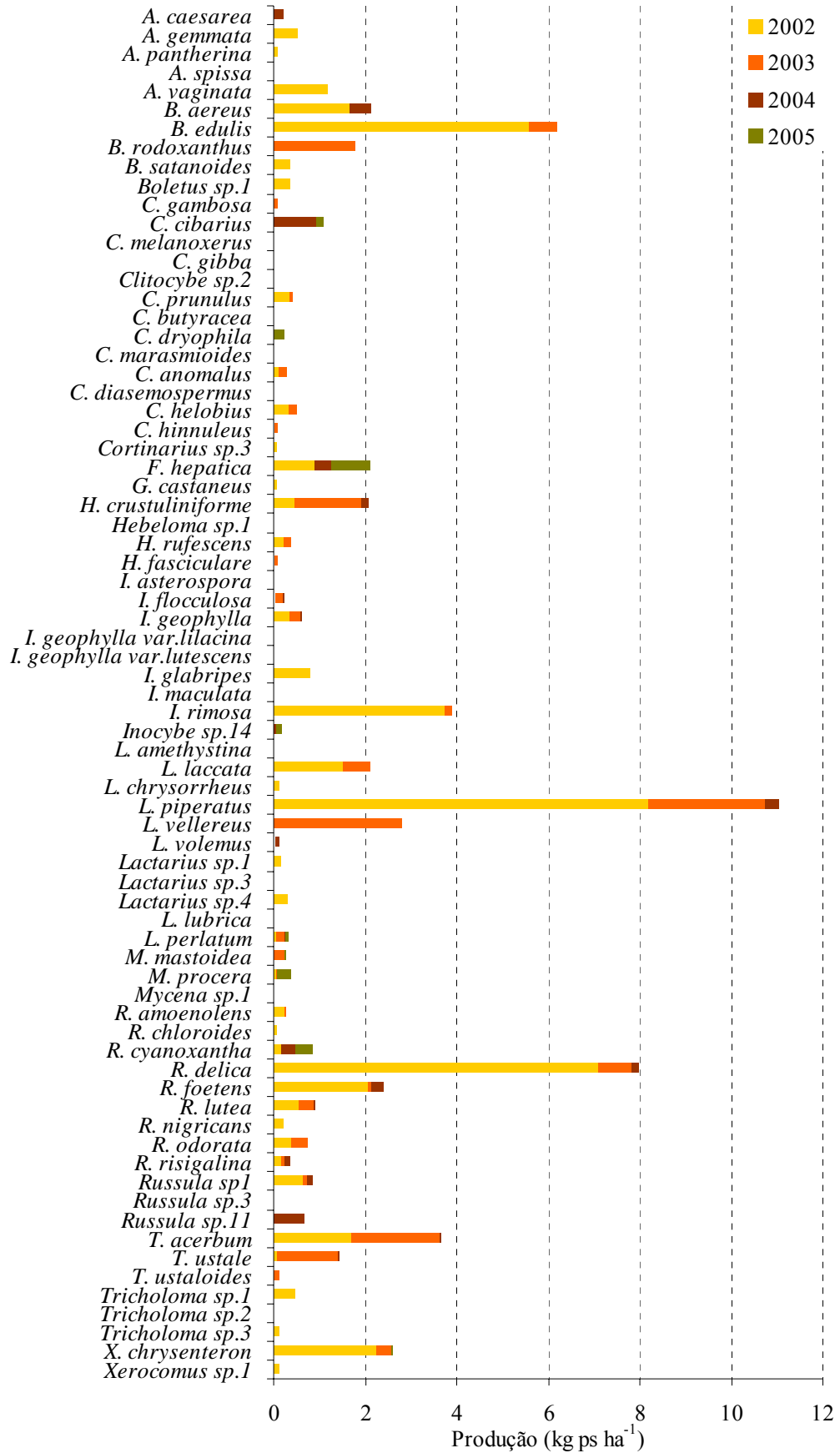
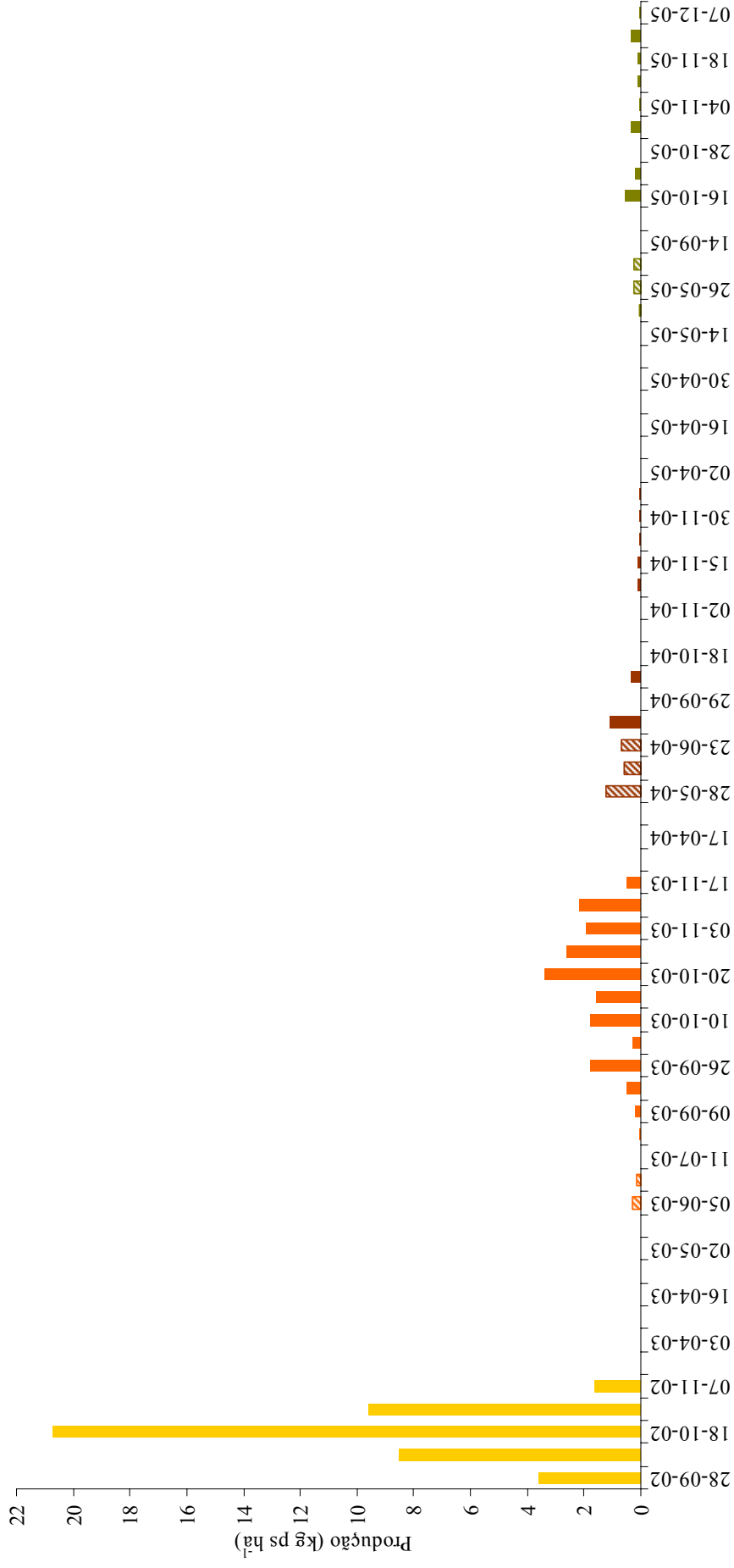


Figura 3.12 Produção das diferentes espécies macrofúngicas recolhidas durante os quatro anos estudados.



**Figura 3.13** Produção total de macrofungos, expressa em kg de peso seco (ps) por hectare, nas várias datas de amostragem dos quatro anos em estudo. As amostragens de cada ano estão assinaladas por cores diferentes (amarelo - 2002, laranja - 2003, castanho - 2004 e verde - 2005), sendo feita a distinção entre a época de frutificação de Outono (coluna preenchida) e de Primavera (coluna a tracejado).

Setembro (1,1 kg/ha) e na de 2005 foi em 16 de Outubro (0,5 kg/ha). O ano de 2004 caracterizou-se por apresentar uma maior produção total de macrofungos na época de frutificação da Primavera (2,5 kg/ha) em relação à época de Outono onde a produção total foi de 1,8 kg/ha. Nos anos de 2003 e 2005 apenas foram produzidos, na época de frutificação da Primavera, 0,5 kg/ha e 0,6 kg/ha de macrofungos, respectivamente. O valor de maior produção registado por saída de campo, nesta época de frutificação, foi em 2002 a 5 de Junho (0,3 kg/ha), em 2003 a 28 de Maio (1,2 kg/ha) e em 2005 a 26 de Maio (0,3 kg/ha).

### 3.2.9 Espécies macrofúngicas ocorrentes fora das parcelas amostradas

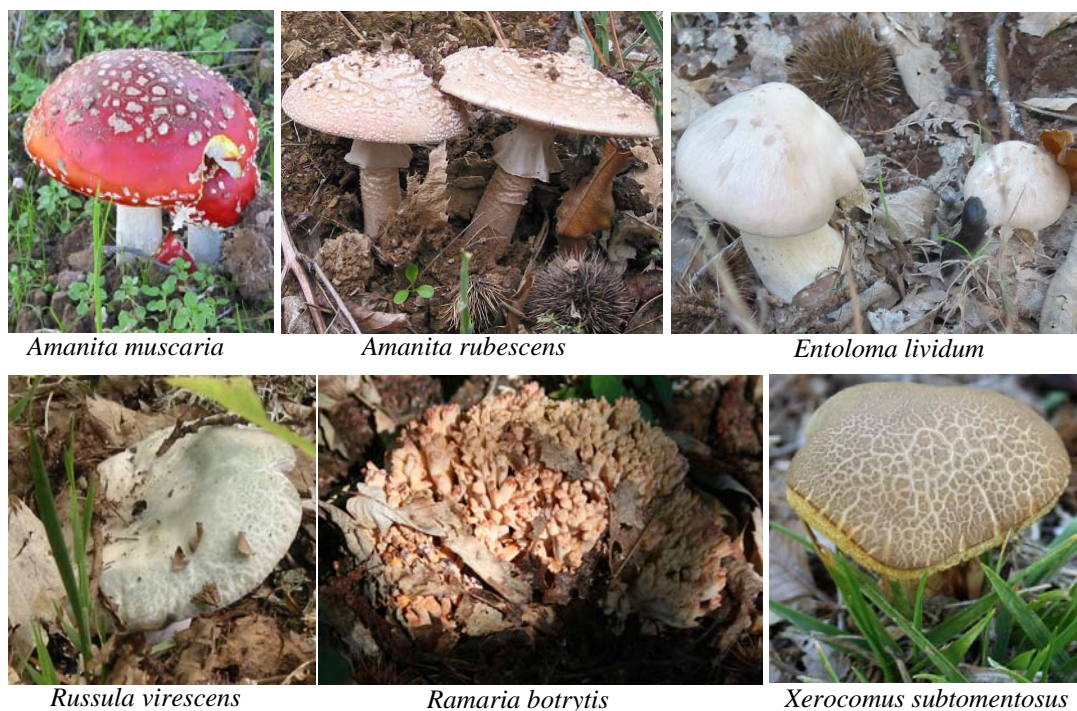
Para além das 73 espécies macrofúngicas inventariadas nas cinco parcelas estabelecidas, foram também registadas outras espécies macrofúngicas noutras locais do souto. Estes registos englobam colheitas esporádicas de espécies, que se encontram listadas na tabela 3.5, estando algumas delas ilustradas na figura 3.14. Nestas colheitas foram identificadas um total de 13 espécies macrofúngicas pertencentes a 10 famílias, sendo as mais representativas as famílias Boletaceae, Bolbitiaceae e Pluteaceae, cada uma com duas espécies. A maioria das espécies eram micorrízicas (11) sendo as restantes (2) saprófitas e/ou parasitas.

**Tabela 3.5** Espécies macrofúngicas registadas fora das parcelas estudadas ao longo do presente estudo, respectivo grupo trófico (m – micorrízico, s – saprófita, p – parasita) e comestibilidade (NC – não comestível, C – comestível).

Família e espécies	Trofia	Comest
<b>Agaricaceae</b>		
<i>Macrolepiota rhacodes</i> (Vittad.) Singer	s	C
<b>Boletaceae</b>		
<i>Boletus aestivalis</i> (Paulet) Fr.	m	C
<i>Xerocomus subtomentosus</i> (L.) Fr.	m	C
<b>Bolbitiaceae</b>		
<i>Hebeloma hiemale</i> Bres.	m	NC
<i>Hebeloma sinapizans</i> (Fr.) Sacc.	m	NC
<b>Entolomataceae</b>		
<i>Entoloma lividum</i> (Bull.) Quéf.	m	NC
<b>Marasmiaceae</b>		
<i>Xerula radicata</i> (Relhan) Dörfelt	s (p?)	NC

**Tabela 3.5** Continuação.

Família e espécies	Trofia	Comest
<b>Paxillaceae</b>		
<i>Paxillus involutus</i> (Batsch) Fr.	m	NC
<b>Pluteaceae</b>		
<i>Amanita muscaria</i> (L.) Lam.	m	NC
<i>Amanita rubescens</i> Pers.	m	C
<b>Ramariaceae</b>		
<i>Ramaria botrytis</i> (Pers.) Ricken	m	C
<b>Russulaceae</b>		
<i>Russula virescens</i> (Schaeff.) Fr.	m	C
<b>Sclerodermataceae</b>		
<i>Pisolithus tinctorius</i> (Pers.) Coker & Couch	m	C



**Figura 3.14** Cogumelos de algumas das espécies macrofúngicas, associadas à plantação de *Castanea sativa*, colhidas fora das parcelas estudadas. As imagens foram obtidas no local de colheita, não se reportando a nenhuma época/ano específica.

### 3.2.10 Influência da temperatura e precipitação na riqueza e abundância de espécies macrofúngicas

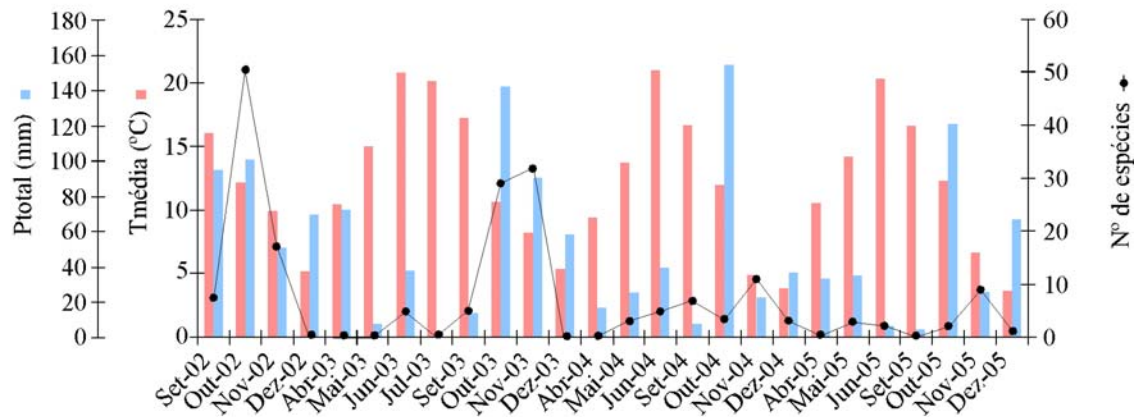
Para avaliar o efeito da temperatura (média, mínima, máxima) e da precipitação total, na riqueza e abundância de espécies macrofúngicas, foram recolhidos os respectivos dados climáticos da estação meteorológica mais próxima das parcelas

inventariadas (Estação meteorológica da Quinta de Santa Apolónia, do Instituto Politécnico de Bragança, situada a 6 Km do souto estudado), desde Setembro de 2002 até Dezembro de 2005. Os resultados referentes aos valores de temperatura média mensal e da precipitação total mensal foram comparados com o número de espécies macrofúngicas e de carpóforos registados em cada mês, para os quatro anos de estudo (Figura 3.15). A precipitação total mensal registada foi variável ao longo dos meses, em especial nos meses correspondentes à época do Outono. Em 2002 e 2003, o seu valor foi mais ou menos constante para 2 ou 3 meses da época do Outono, enquanto que em 2004 e 2005 registou-se precipitação praticamente num único mês (Outubro), sendo a precipitação total dos restantes meses do Outono muito inferior. De uma maneira geral, nos meses onde se regista o maior número de espécies e de carpóforos corresponde aos meses onde ocorreu maior precipitação total. Este aspecto foi evidente em Outubro de 2002; Junho, Outubro e Novembro de 2003; Maio, Outubro e Novembro de 2005. No que respeita à temperatura, verificou-se que os valores médios mensais eram muito similares para os diferentes meses do Outono e da Primavera (Figura 3.15).

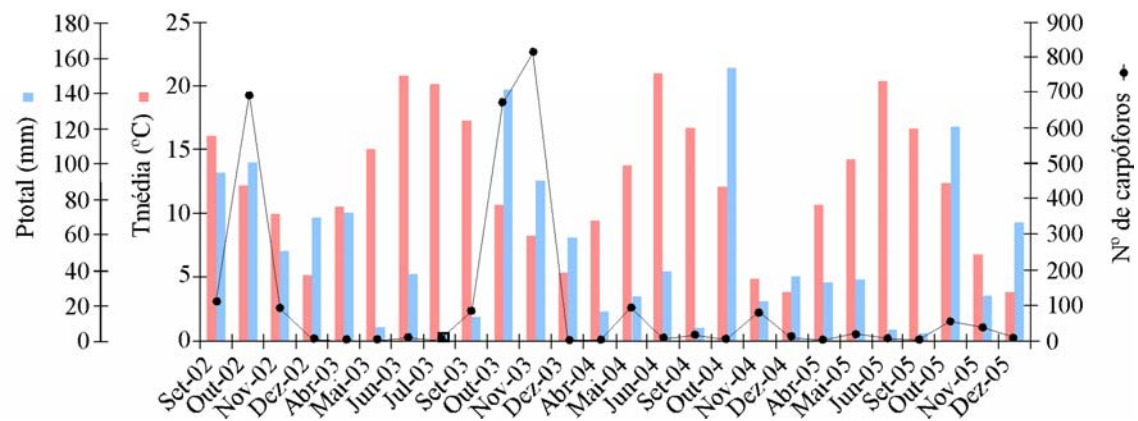
Tal como referido em 3.2.5 e 3.2.6, o maior número de espécies e de carpóforos foi registado durante os meses do Outono, correspondendo ao período onde os valores de precipitação total foram superiores em relação aos restantes meses do ano e as temperaturas médias mensais eram amenas (Figura 3.15). Nos meses correspondentes ao período da Primavera o número de espécies e de carpóforos foi inferior (com excepção de 2004), altura onde a precipitação total mensal foi mais baixa e as temperaturas médias mensais ligeiramente superiores em relação ao Outono.

A influência dos factores climáticos (temperatura média, mínima, máxima, e precipitação total) no número de carpóforos e de espécies macrofúngicas (total, micorrízica e não micorrízica) colhidas de 2002 a 2005 foi avaliada mediante o cálculo do coeficiente de correlação de *Spearman*. A determinação deste valor foi efectuada utilizando os valores médios de temperatura média, mínima, máxima, e precipitação total referentes a 3, 5, 10, 15, 20 e 30 dias previamente à data de colheita (Tabela 3.6). Os resultados obtidos indicam que o número de espécies macrofúngicas e de carpóforos se encontra significativamente correlacionado com a precipitação total que ocorreu desde os 3 dias até aos 30 dias previamente à data de colheita dos macrofungos. A temperatura (média, máxima e mínima) também influencia significativamente o número de espécies e de carpóforos, mas apenas nos 3 dias prévios à data de colheita.

A



B



**Figura 3.15** Número de espécies macrofúngicas (A) e número de carpóforos colhidos (B) em relação aos valores de temperatura média (Tmédia, °C) e precipitação total (Ptotal, mm) registados no período de colheita, desde Setembro de 2002 até Dezembro de 2005.

Enquanto que no caso da precipitação total se verificou que a correlação com o número de espécies e de carpóforos era directa e forte (valores de coeficientes de correlação de *Spearman* a variar entre 0,34 e 0,11; Tabela 3.6), no caso da temperatura (média, máxima e mínima) a correlação era inversamente proporcional e fraca (valores de coeficientes de correlação de *Spearman* a variar entre 0,16 e 0,13; Tabela 3.6). De salientar que não foi encontrada qualquer relação entre a temperatura mínima e o número de espécies e de carpóforos não micorrízicos.

**Tabela 3.6** Coeficientes de correlação de *Spearman* entre o número de carpóforos e de espécies macrofúngicas (total, micorrízica e não micorrízica) colhidos de 2002 a 2005 e os factores climáticos (temperatura média, máxima, mínima e precipitação acumulada até 3-, 5-, 10-, 15-, 20- e 30- dias antes da data de colheita).

		Dias antes da colheita					
		3	5	10	15	20	30
		Temperatura média					
N° espécies	Total	-0,15**	ns	ns	ns	ns	ns
	Micorrízicos	-0,14*	ns	ns	ns	ns	ns
	Não Micorrízicos	-0,13*	ns	ns	ns	ns	ns
N° carpóforos	Total	-0,15**	ns	ns	ns	ns	ns
	Micorrízicos	-0,14*	ns	ns	ns	ns	ns
	Não Micorrízicos	-0,13*	ns	ns	ns	ns	ns
		Temperatura máxima					
N° espécies	Total	-0,16**	ns	ns	ns	ns	ns
	Micorrízicos	-0,13*	ns	ns	ns	ns	ns
	Não Micorrízicos	-0,13*	ns	ns	ns	ns	ns
N° carpóforos	Total	-0,15**	ns	ns	ns	ns	ns
	Micorrízicos	-0,13*	ns	ns	ns	ns	ns
	Não Micorrízicos	-0,13*	ns	ns	ns	ns	ns
		Temperatura mínima					
N° espécies	Total	-0,11*	ns	ns	ns	ns	ns
	Micorrízicos	-0,16**	ns	ns	ns	ns	ns
	Não Micorrízicos	ns	ns	ns	ns	ns	ns
N° carpóforos	Total	-0,14*	ns	ns	ns	ns	ns
	Micorrízicos	-0,16**	ns	ns	ns	ns	ns
	Não Micorrízicos	ns	ns	ns	ns	ns	ns
		Precipitação acumulada					
N° espécies	Total	0,31***	0,18**	0,20***	0,18***	0,25***	0,25***
	Micorrízicos	0,17**	ns	0,12*	0,11*	0,19***	0,21***
	Não Micorrízicos	0,33***	0,31***	0,27***	0,26***	0,28***	0,26***
N° carpóforos	Total	0,27***	0,20***	0,21***	0,18***	0,24***	0,25***
	Micorrízicos	0,17**	ns	0,12*	0,11*	0,18**	0,20***
	Não Micorrízicos	0,34***	0,31***	0,27***	0,26***	0,29***	0,26***

ns - não significativo; \* significativo ao nível de 0,05; \*\* significativo ao nível de 0,01; \*\*\* significativo ao nível 0,001.

Diferenças apreciáveis foram evidenciadas entre os grupos tróficos, micorrízicos e não micorrízicos (Tabela 3.6). Os macrofungos não micorrízicos apresentaram sempre

valores de correlação de *Spearman* superiores em relação aos dos macrofungos micorrízicos. No caso dos macrofungos micorrízicos o valor de *Spearman* mais elevado foi detectado nas correlações estabelecidas com dados de precipitação total de 30 dias previamente à data de colheita (0,21 para o número de espécies e 0,20 para o número de carpóforos). Pelo contrário, nos macrofungos não micorrízicos, o valor de correlação de *Spearman* foi superior com a precipitação total que ocorreu em 3 dias antes da colheita (0,33 para o número de espécies e 0,34 para o número de carpóforos).

### 3.3 DISCUSSÃO

O número de espécies de fungos é muito elevado, apontando algumas estimativas para a existência de 1,5 milhões de espécies, das quais apenas 5 a 10% se encontram descritas (Hawksworth, 2001). Num *habitat* natural, é sugerido haver uma razão de fungos para plantas de aproximadamente 6:1 (ECCF, 2002). Os macrofungos constituem um grupo artificial de fungos baseado no tamanho das estruturas reprodutoras, os carpóforos ou cogumelos, que são visíveis a olho nu. Apesar da relevância dos macrofungos nos ecossistemas naturais, uma vez que exercem um papel fundamental ao nível da decomposição e mineralização de compostos orgânicos e estabelecem associações simbióticas com plantas, estes organismos são pouco estudados e as suas características pouco conhecidas. Em Portugal, este cenário é agravado pela falta de tradição micológica referindo-se, os poucos trabalhos publicados, maioritariamente a registos esporádicos da ocorrência de espécies macrofúngicas.

O estudo da diversidade macrofúngica associada a uma das principais culturas do nordeste transmontano, o castanheiro, constitui um dos objectivos do presente trabalho. Este estudo decorreu desde Setembro de 2002 até Dezembro de 2005, e constitui o primeiro trabalho de inventariação macrofúngica efectuado de forma sistemática e a longo prazo realizado na região. Serão discutidas a influência dos factores climáticos, precipitação e temperatura, na riqueza e abundância de espécies macrofúngicas e as potencialidades da exploração de cogumelos comestíveis para fins comerciais.

#### *Inventariação efectuada no souto estudado*

Os estudos de inventariação de macrofungos são frequentemente dificultados por algumas das suas características biológicas, tais como a sazonalidade de frutificação fortemente relacionada com as condições climáticas (Eveling *et al.*, 1990; Jonsson *et al.*, 2000; Laganà *et al.*, 2002; Salerni *et al.*, 2002), e a curta longevidade dos carpóforos (normalmente de 4 a 19 dias) (Richardson, 1970; Dickson, 1997). Outros factores que contribuem para a falta de estudos nesta área compreendem a dificuldade na identificação da maioria dos *taxa*, exigindo muitas vezes literatura especializada, assim como as dificuldades a nível taxonómico, nomeadamente no que concerne às classificações propostas e à nomenclatura que nem sempre são claras (Watling, 1995; Castro, 2002).

O nordeste transmontano, pelas suas características edafo-climáticas e pela diversidade de flora, é sugerido como sendo uma das regiões europeias com maiores recursos em cogumelos silvestres, muitos dos quais de grande importância gastronómica (Cano, 2002). O presente estudo de inventariação macrofúngica, realizado numa das principais culturas desta região, o castanheiro, vem corroborar esta suposição. Verificou-se que, associado ao souto, existe uma flora micológica diversificada, tendo sido registadas 73 espécies, pertencentes a 16 famílias e 23 géneros. Os géneros mais representados foram, por ordem decrescente, *Russula*, *Inocybe*, *Lactarius*, *Tricholoma*, *Boletus*, *Cortinarius* e *Amanita*, o que está de acordo com o previamente descrito para esta região (Azevedo, 1989; Menezes, 1990; Meireles, 1997; Borges, 1998). Apesar da grande biodiversidade de espécies macrofúngicas associadas à cultura do castanheiro, é previsível que esta possa ainda ser maior se se considerar o registo adicional de 13 espécies recolhidas fora das parcelas de amostragem. Sendo assim, o número total de espécies macrofúngicas identificadas como estando associadas à plantação do castanheiro aumenta para 86. Estudos anteriores de inventariação, realizados em apenas quatro dos inúmeros *habitats* existentes nesta região, carvalhal de *Quercus pyrenaica*, souto (*Castanea sativa*), mancha de vegetação ultrabásica e pinhal de *Pinus pinaster* tinham igualmente sugerido a existência de uma enorme diversidade macrofúngica (Azevedo, 1989; Menezes, 1990; Barbosa, 1994; Meireles, 1997; Barrote, 1998; Borges, 1998; Baptista *et al.*, 2003; Branco, 2003; Baptista *et al.*, 2005).

A comparação das 86 espécies macrofúngicas inventariadas no presente estudo com as anteriormente registadas em *C. sativa* na região de Trás-os-Montes (Anexo 1; Azevedo, 1989; Menezes, 1990; Meireles, 1997; Borges, 1998) mostrou a existência de 31 novos registos, pertencentes a 11 famílias e a 14 géneros. Nestes novos registos, as famílias mais representadas foram Cortinariaceae com 11 espécies (*Cortinarius anomalus*, *C. diasemospermus*, *C. helobius*, *C. hinnuleus*, *Inocybe asterospora*, *I. flocculosa*, *I. geophylla* var. *lilacina*, *I. geophylla* var. *lutescens*, *I. glabripes*, *I. maculata*, *I. rimosa*), Russulaceae com 4 espécies (*Russula amoenolens*, *R. chloroides*, *R. foetens*, *R. odorata*) e Tricholomataceae igualmente com 4 espécies (*Calocybe gambosa*, *Collybia marasmioides*, *Tricholoma acerbum*, *T. ustale*). As restantes espécies identificadas somente neste estudo integram as famílias Boletaceae (*Boletus aereus*, *B. rhodoxanthus*, *B. satanoides*), Agaricaceae (*Macrolepiota mastoidea*, *M. rhacodes*), Cantharellaceae (*Cantharellus melanoxeros*), Gyroporaceae

(*Gyroporus castaneus*), Bolbitiaceae (*Hebeloma hiemale*, *H. sinapizans*), Entolomataceae (*Entoloma lividum*), Marasmiaceae (*Xerula radicata*) e Ramariaceae (*Ramaria botrytis*). Possivelmente, o registo de todas estas espécies, anteriormente ausentes nos estudos de inventariação de macrofungos na região transmontana, pode ser devido a diferenças dos ecossistemas comparados, nomeadamente ao nível (i) da sua estrutura, por exemplo no regime de exploração do castanheiro (souto ou castiçal), (ii) da sua composição, nomeadamente na diversidade da flora arbustiva, e (iii) do seu funcionamento (sucessão da vegetação, decomposição e ciclo de nutrientes) (Ferris *et al.*, 2000). As alterações ambientais que se têm verificado nos últimos anos, caracterizada por reduções ao nível da precipitação total, podem também constituir uma possível causa para o registo de novas espécies. Existem indícios de que as perturbações provocadas por temperaturas extremas e secas periódicas podem favorecer o aparecimento de novos fungos capazes de dar resposta a essas perturbações em detrimento de outros (Arnolds, 1991; Bruns, 1995).

Algumas das dificuldades inerentes ao desenvolvimento de estudos de inventariação macrofúngica encontram-se bem patentes no presente trabalho, por não ter sido possível a identificação até à espécie de 16 das 86 espécies encontradas. Este aspecto poderá ter sido devido a algumas das características biológicas apresentadas pelos macrofungos e das quais se destacam:

- (i) a ocorrência de poucos carpóforos de algumas espécies, que ocorrem somente num dos anos estudados, o que dificulta a identificação e/ou a sua confirmação;
- (ii) apesar de alguns carpóforos persistirem alguns anos, como os dos fungos da família Polyporaceae (*Fomes*, *Ganoderma*, entre outros), outros apresentam uma longevidade muito curta, podendo durar apenas algumas horas (*Coprinus* spp.) ou dias (*Inocybe* spp., *Mycena* spp.) (Salerni *et al.*, 2002), o que dificulta a sua identificação;
- (iii) o aspecto morfológico de uma espécie macrofúngica varia em função da idade, complicando a sua identificação se não existirem exemplares em diferentes estádios de crescimento.

A falta de bibliografia especializada e a subjectividade de determinadas características, como sabor e aroma, vulgarmente utilizadas na identificação de alguns *taxa*, tais como *Russula* spp. e *Lactarius* spp., foram igualmente factores que dificultaram a identificação. Com a elaboração de um herbário na Escola Superior

Agrária de Bragança, onde foram armazenados os exemplares correspondentes aos registos apresentados, espera-se vir a dissipar possíveis dúvidas actuais e mesmo futuras.

Um outro problema inerente à avaliação da diversidade macrofúngica reside na flutuação do aparecimento, associada à curta longevidade dos carpóforos (Watling, 1995). Este problema só será ultrapassado, com a realização de amostragens ao longo de vários anos sucessivos (Tofts & Orton, 1998). Somente desta forma será possível obter medidas de diversidade rigorosas. O número mínimo de anos necessários para uma inventariação de macrofungos credível não é consensual, podendo variar entre os dois (Nara *et al.*, 2003) e os 10 anos (Orton, 1986). Apesar da divergência de opiniões, a maioria dos investigadores considera que o período de cinco anos é o mais adequado, por permitir observar as espécies que surgem todos os anos, cada dois ou três anos (Castro, 2002). As inventariações efectuadas durante este período de tempo permitem identificar até 80% das espécies existentes num determinado ecossistema (Castro, 2002).

Uma forma de avaliar se um determinado estudo de inventariação se encontra completo, passa pela realização de curvas cumulativas de espécies, por fornecer indicação do número previsível de espécies no *habitat* estudado (Soberón & Llorente, 1993). Estas curvas permitem ainda inferir o esforço da amostragem requerido para que a inventariação seja o mais completa e rigorosa (Soberón & Llorente, 1993). Quando a curva cumulativa de espécies atinge a sua assíntota significa que todas as espécies previsivelmente existentes numa determinada área foram registadas. Pelo contrário, a não estabilização da curva significa que outras espécies poderão ainda ser encontradas, sendo necessário um maior esforço amostral. A curva cumulativa das espécies macrofúngicas colhidas no souto durante os quatro anos, mostrou uma tendência para a estabilização, o que sugere que este *habitat* foi devidamente amostrado apesar da inventariação não ter sido completa. As amostragens efectuadas permitiram registar cerca de 80,5% do total de espécies macrofúngicas previsivelmente existentes neste souto, ultrapassando o valor de 80% que constitui o mínimo aceitável de acordo com este modelo (Castro, 2002). Foram registadas um total de 73 espécies e a previsão dada pela curva cumulativa era de 91 espécies. Este resultado sugere que o estudo da biodiversidade macrofúngica associada a este ecossistema foi rigoroso, podendo ser considerado credível.

As percentagens de espécies macrofúngicas registadas, face ao total previsivelmente existente em cada um dos anos estudados, variaram consideravelmente. No ano de 2003, o número de espécies observadas alcançou os 80% do número total de espécies previsivelmente existente no souto, mas nos restantes anos tal não se verificou. No que concerne ao ano de 2002, a causa mais provável de se ter registado apenas 64% do número previsível de espécies macrofúngicas existente deveu-se ao reduzido esforço amostral, uma vez que a inventariação ocorreu somente no período do Outono. As condições climáticas desfavoráveis à frutificação dos macrofungos observadas durante 2004 e 2005 poderão, à semelhança do sugerido por diversos autores (Nara *et al.*, 2003), ser a causa mais provável do reduzido número de espécies registado nestes dois anos (44% e 48% do número previsível, respectivamente).

#### ***Diversidade de macrofungos micorrízicos no souto estudado***

As categorias mais usadas, na classificação das espécies macrofúngicas em grupos funcionais, são os grupos tróficos micorrízico, saprófita e parasita. Esta classificação nem sempre é clara, dado que existem espécies com capacidade de pertencer a mais de uma das categorias referidas (revisto por Castro, 2002). Como exemplo, referem-se as espécies *Fistulina hepatica* e *Hypholoma fasciculare* registadas no souto estudado e referenciadas na bibliografia da especialidade como sendo saprófitas e/ou parasitas. *Armillaria mellea* é outro exemplo, o qual parasita as árvores enquanto vivas mas, após a morte destas, continua a crescer sobre os restos lenhosos até os decompor totalmente. Existem ainda espécies micorrízicas que, aquando do início do seu estabelecimento num determinado local, o fazem como saprófitas acabando por se associar a uma planta hospedeira apropriada. Caso não existam hospedeiros a que se possa associar, a espécie acabará por desaparecer do local. Esta dualidade funcional pode ser observada em algumas espécies do género *Laccaria*, *Boletus*, *Amanita*, *Hebeloma* e *Hydnum*. Existem outras espécies que não oferecem qualquer dúvida na sua classificação tais como espécies do género *Russula*, *Cortinarius* e *Inocybe* que pertencem exclusivamente ao grupo dos fungos micorrízicos e espécies do género *Macrolepiota*, *Clitocybe*, *Collybia* e *Mycena* que se incluem no grupo dos fungos saprófitas.

Do total das espécies macrofúngicas colhidas, 82% eram micorrízicas, sendo os restantes 15% e 3% correspondente a espécies saprófitas e saprófitas e/ou parasitas,

respectivamente. Esta elevada predominância de espécies micorrízicas em plantações de castanheiro na região transmontana tinha sido anteriormente verificada em estudos de inventariação (Azevedo, 1989; Menezes, 1990; Meireles, 1997; Borges, 1998). Segundo alguns autores, o número de espécies micorrízicas existentes num determinado ecossistema é dependente da idade das plantas hospedeiras (Mason *et al.*, 1982; Dighton & Mason, 1985). É previsto que o seu número aumente gradualmente até alcançar um valor máximo, que pode variar entre 20-25 anos até 80-199 anos, de acordo com a espécie vegetal hospedeira, decrescendo lentamente a partir daí (Luoma *et al.*, 1991; Keizer & Arnolds, 1994). O elevado número de espécies macrofúngicas micorrízicas registado em relação ao das não micorrízicas pode assim ser justificado, pelo menos em parte, pela idade das plantas do souto estudado que era superior a 100 anos.

A diversidade de macrofungos micorrízicos manifesta-se também na sua distribuição temporal, ou seja, ao longo dos estádios de sucessão das florestas (Allen *et al.*, 1995). Tudo parece indicar que existem fungos característicos dos estádios iniciais dos povoamentos agro-florestais e, da mesma forma, dos estádios mais tardios (Arnolds, 1991; Matsuda & Hijii, 1998; Senn-Irlet & Bieri, 1999; Smith *et al.*, 2002; Nara *et al.*, 2003). A principal razão da existência destes dois grupos reside na disponibilidade de hidratos de carbono, que é menor nas fases jovens dos povoamentos comparativamente aos estádios mais tardios, permitindo o crescimento de fungos com menores necessidades destes compostos (Marx & Cordell, 1989; Bruns, 1995). Outra hipótese relaciona a sucessão dos fungos micorrízicos com as diferentes formas de nutrientes disponíveis no solo. Os fungos dos estádios iniciais utilizam nutrientes predominantemente na forma mineral, enquanto que os de estádios tardios utilizam-nos na forma orgânica (Eaton & Ayres, 2002). Assim, a substituição de umas espécies de macrofungos por outras, ao longo do tempo, poderá em parte justificar as diferenças observadas entre o souto estudado e os restantes estudos de biodiversidade efectuados na região transmontana para a mesma cultura, dado que as plantações possuíam idades de instalação diferentes. Esta hipótese é reforçada pelo facto de se terem detectado pela primeira vez espécies pertencentes aos géneros *Cortinarius* e *Russula*, apontados como sendo característicos dos estádios mais tardios da sucessão (Matsuda & Hijii, 1998; Nara *et al.*, 2003).

As práticas culturais parecem igualmente ter influência na diversidade e abundância de espécies macrofúngicas, em especial das espécies micorrízicas (Dighton

& Mason, 1985; Mason *et al.*, 1987; Baptista *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2006). Soutos com a mesma localização do estudado, submetidos a diferentes intervenções culturais no que se refere à mobilização do solo, apresentavam diferenças no número de espécies macrofúngicas, de carpóforos e de produção de biomassa. Estes parâmetros apresentavam valores significativamente inferiores no soto sujeito a mobilização em comparação com o soto não mobilizado (Baptista *et al.*, 2005).

A clara dominância de espécies macrofúngicas micorrízicas em relação a outros macrofungos (82%), observada no soto estudado, sugere ainda que este ecossistema se encontra bem conservado. A proporção de espécies micorrízicas tem sido sugerida como um importante indicador do equilíbrio e bom estado de conservação das florestas (Laganà *et al.*, 2002), tendo sido estabelecida uma relação directa entre a percentagem de espécies micorrízicas (M) e o grau de distúrbio numa floresta ( $60\% < M < 40\%$  corresponde a um distúrbio latente;  $40\% < M < 20\%$  a um distúrbio agudo; e  $M < 20\%$  a um distúrbio letal) (Schlechte, 1987; Fellner, 1989; Fellner & Soukup, 1991).

### ***Riqueza e abundância de espécies macrofúngicas no soto estudado***

O número total de espécies inventariadas no soto amostrado foi muito variável para os quatro anos estudados. Desde 2002 até 2005, verificou-se uma redução drástica do número de espécies macrofúngicas, tendo-se registado um total de 56, 43, 25 e 12 espécies, respectivamente. Esta diminuição é confirmada por qualquer um dos índices de diversidade calculados (*Shannon-Wiener* ou *Simpson*), os quais apresentaram valores significativamente diferentes entre os quatro anos, atingindo valores máximos em 2002 ( $2,0 \pm 0,17$  e  $8,1 \pm 0,98$ , respectivamente) e mínimos em 2005 ( $0,03 \pm 0,03$  e  $1,1 \pm 0,06$ , respectivamente). Um índice de diversidade elevado é indicativo, na maioria dos casos, de uma comunidade bem estruturada, onde ocorrem muitas espécies e geralmente poucos exemplares de cada espécie. Apesar de não estar esclarecida a causa desta redução do número de espécies ao longo dos anos, é sugerido que esta possa estar relacionada com as alterações climáticas verificadas em 2004 e 2005, onde os valores de precipitação total registados na região foram muito baixos. Esta suposição baseia-se no facto dos outros factores com influência na diversidade dos macrofungos, nomeadamente o pH do solo, a disponibilidade de nutrientes e os padrões de sucessão

da vegetação (Webster, 1980; Calonge, 1983; Ferris *et al.*, 2000), não terem sofrido alterações substanciais ao longo do estudo.

Para além do número de espécies, a quantidade de carpóforos colhidos durante os quatro anos estudados também sofreu alterações, assim como a espécie mais abundante em cada ano. Do total dos carpóforos colhidos em 2002 (814 exemplares), 2003 (1514 exemplares), 2004 (211 exemplares) e 2005 (138 exemplares), verificou-se que as espécies mais abundantes foram *Laccaria laccata*, *Hebeloma crustuliniforme*, *Cantharellus cibarius* e *Collybia dryophila*, respectivamente. No entanto, as espécies que surgiram com maior abundância no total dos quatro anos foram *L. laccata*, *H. crustuliniforme* e *Inocybe geophylla* que representaram, respectivamente, 12,10%, 11,54% e 11,32% dos 2677 exemplares colhidos durante os quatro anos. As diferenças observadas podem, à semelhança do referido anteriormente, estar relacionadas com as alterações dos factores ambientais, como é o caso da precipitação que diminuiu drasticamente nos últimos dois anos. A imposição deste stresse poderá ter favorecido uma espécie em relação a outras, resultando num aumento da sua dominância e na redução da diversidade (tal como evidenciado pelos índices de diversidade calculados). De facto, coincidente com o período de seca observado no ano de 2005, registou-se uma redução da diversidade e aumento da dominância da espécie saprófita *Collybia dryophila* (ao contrário do observado nos anos anteriores cuja dominância foi ocupada por espécies micorrízicas), sugerindo que o stresse imposto favorece o aparecimento específico desta espécie, provavelmente por ser capaz de dar resposta a essas perturbações (Arnolds, 1991; Bruns, 1995).

Apesar de na maioria dos meses, o número máximo de espécies ter sido coincidente com o número máximo de carpóforos, houve alguns em que tal não se verificou, como por exemplo em Maio e Junho de 2004 e em Outubro e Novembro de 2005. A não coincidência do número máximo de carpóforos e de espécies pode ser devido às características intrínsecas de cada espécie, tal como sugerido por outros autores (Laganà *et al.*, 2002). A abundância das diferentes espécies macrofúngicas, para além de ser influenciada pelas condições climáticas, depende das suas características intrínsecas, uma vez que determinados grupos, tais como os fungos saprófitas, frutificam em grande número enquanto que outros formam carpóforos isolados (Laganà *et al.*, 2002).

***Ocorrência e fenologia de frutificação de espécies macrofúngicas no souto estudado***

No conjunto dos anos estudados, as espécies *Hebeloma crustuliniforme* e *Inocybe geophylla* foram as que surgiram com maior frequência, estando presentes em 17,6% e 15,1% das amostras, respectivamente. Verificou-se igualmente que a maioria das espécies macrofúngicas inventariadas (46% do total das espécies) ocorreram somente num dos anos estudados, tendo 2002 apresentado o maior número de espécies exclusivas (20 espécies). As espécies com ocorrência exclusiva num dos anos pertencem sobretudo aos géneros *Amanita*, *Boletus*, *Lactarius* e *Tricholoma*. Apenas 4% do total de espécies inventariado teve ocorrência nos quatro anos, nomeadamente as espécies *Lycoperdon perlatum*, *Russula lutea* e *R. cyanoxantha*. A análise de similaridade do número de espécies macrofúngicas comuns nos vários anos, realizada mediante o cálculo do índice de *Sorensen*, revelou que foi entre 2002 e 2003 que surgiu o maior número de espécies comuns (índice de *Sorensen* igual a 0,63). Pelo contrário, a maioria das espécies com ocorrência durante 2002 foram diferentes às surgidas durante 2005 (índice de *Sorensen* igual 0,24). Estes resultados corroboram a sugestão anteriormente referida, sobre a necessidade dos estudos de inventariação de macrofungos ocorrerem durante vários anos sucessivos, de forma a registar o número máximo de espécies.

O carácter esporádico de frutificação da maioria das espécies macrofúngicas é um fenómeno vulgar (Arnolds, 1995; Watling, 1995; O'Dell *et al.*, 1999; Castro, 2002; Smith *et al.*, 2002). Segundo alguns autores, esta sazonalidade pode ser devida (i) à frutificação das espécies ocorrer em resposta a determinadas condições climáticas específicas, e (ii) por existirem espécies que frutificam somente ao fim de dois ou três anos, sendo esta periodicidade regulada por ciclos biológicos praticamente desconhecidos (O'Dell *et al.*, 1999; Castro, 2002).

No presente estudo verificou-se a existência de duas épocas de frutificação macrofúngica, uma no Outono e outra na Primavera. A época de frutificação do Outono ocorreu entre o início de Setembro e o fim de Novembro, e foi onde se observou um maior número de espécies e de carpóforos. A época de frutificação da Primavera, com menor expressão, ocorreu entre finais de Maio e fim de Junho. Nos estudos de inventariação macrofúngica, realizados na região de Trás-os-Montes, em carvalhais (Branco, 2003) e em soutos e castiçais (Azevedo, 1989) verificou-se a mesma fenologia de frutificação, tendo sido também a época de frutificação do Outono aquela

onde se observou uma maior diversidade e abundância de carpóforos. As épocas de frutificação do Outono e Primavera foram coincidentes com as alturas do ano onde as temperaturas foram amenas e as precipitações abundantes. Este facto está de acordo com diversos autores que sugerem que a fenologia de frutificação está directamente relacionada com as condições climáticas (Eveling *et al.*, 1990; Jennings & Lysek, 1996; Jonsson *et al.*, 2000; Laganà *et al.*, 2002; Salerni *et al.*, 2002).

No conjunto dos anos verificou-se que 85% do número total de espécies inventariadas foram registadas exclusivamente no Outono. Alguns dos géneros onde tal se verificou foram *Amanita*, *Cortinarius*, *Inocybe* e *Tricholoma*. Somente 15% do total inventariado, ocorreram em ambas as épocas de frutificação, a maioria das quais pertencentes ao género *Russula*, *Lactarius* e *Boletus*. Este resultado é reforçado pelos baixos valores do índice de *Sorensen* obtidos para análise de similaridade do número de espécies macrofúngicas comuns às duas épocas de frutificação, que traduziram sempre reduzida similaridade entre a época de frutificação do Outono e da Primavera. Adicionalmente, este resultado está de acordo com os obtidos por outros autores em estudos de inventariação macrofúngica associada a *Quercus pyrenaica* (Branco, 2003) e a *C. sativa* (Azevedo, 1989), realizados na mesma região a que se reporta o presente trabalho. Apesar de não estar esclarecida a causa provável da exclusividade de determinadas espécies numa época de frutificação, pensa-se que esta possa estar relacionada com as condições climáticas, temperatura e precipitação. As espécies com ocorrência exclusiva no Outono provavelmente têm necessidades de precipitação total superiores e de temperatura inferiores em relação às que surgem na Primavera. Estas espécies podem igualmente conter informação genética para que a sua frutificação ocorra somente nesta época do ano (Guinberteau & Courtecuisse, 1997). O estado fisiológico das plantas também poderá ter alguma influência na ocorrência da frutificação, dado que foram principalmente as espécies micorrízicas que apresentaram exclusividade numa das épocas de frutificação (Brundrett *et al.*, 1996).

No presente estudo, a espécie mais frequente na época de Outono foi *H. crustuliniforme*, enquanto que na época de Primavera foram as espécies *C. cibarius* e *R. risigalina*. Em trabalhos anteriores de inventariação macrofúngica associada a castanheiro, realizado em vários concelhos transmontanos, foi igualmente observado uma maior frequência de *C. cibarius* durante a Primavera (Azevedo, 1989). No entanto, no presente estudo, as espécies encontradas em determinada época não se tornam a

encontrar, necessariamente, na mesma época num ano diferente. Adicionalmente, a ocorrência de uma mesma espécie na época de Primavera e Outono não aconteceu necessariamente no mesmo ano, como foi observado para *B. aereus*, *R. risigalina*, *R. cyanoxantha*, *L. volemus* e *C. cibarius*. Estes resultados são corroborados pela baixa similaridade no número de espécies comuns entre épocas de frutificação (Primavera e Outono) para o mesmo ano, traduzida pelo reduzido índice de *Sorensen*. Estas flutuações na frutificação podem, à semelhança do sugerido anteriormente, estar relacionada quer com as alterações climáticas, quer com a programação genética das diferentes espécies.

### ***Condições climáticas na produção de macrofungos***

Durante o período estudado, em particular na época de frutificação do Outono, verificaram-se drásticas variações anuais no número de espécies e de carpóforos recolhidos. No Outono de 2002 e 2003, onde ocorreram precipitações totais superiores a 300 mm, registou-se um maior número de espécies e de carpóforos, sendo que a sua ocorrência nas várias saídas de campo realizadas descreveu claramente uma curva normal. Pelo contrário no Outono de 2004 e 2005, com precipitações totais a rondarem os 200 mm, o número de espécies e de carpóforos foi substancialmente inferior, sendo que a sua ocorrência não correspondeu a uma curva normal. De igual modo, o maior número de espécies e de carpóforos foi registado durante os meses do Outono, onde os valores de precipitação total foram superiores face aos restantes meses do ano e as temperaturas médias mensais eram amenas. Na época da Primavera, com temperaturas médias superiores e precipitação total mensal mais baixa, o número registado de espécies e carpóforos foi inferior. Estes resultados sugerem que a frutificação das diferentes espécies macrofúngicas possa estar relacionada com a precipitação total. De facto, o maior número de espécies e de carpóforos foi observado, geralmente, nos meses com precipitação abundante e temperaturas médias amenas, como em Outubro de 2002; Junho, Outubro e Novembro de 2003; Maio, Outubro e Novembro de 2005. Estes resultados são corroborados por aqueles obtidos em estudos de inventariação macrofúngica que têm indicado que o maior número de espécies e de carpóforos é observado nos meses onde a precipitação total é abundante e as temperaturas médias amenas (Eveling *et al.*, 1990; Jennings & Lysek, 1996; Jonsson *et al.*, 2000; Laganà *et al.*, 2002; Salerni *et al.*, 2002).

O efeito da precipitação total na frutificação dos macrofungos tinha sido anteriormente verificada por alguns autores, tendo sido mesmo considerado como um dos factores mais importantes neste processo (Lange, 1978; Eveling *et al.*, 1990; Laganà *et al.*, 2002; Salerni *et al.*, 2002). Nas análises efectuadas, a precipitação tem revelado possuir uma acção positiva (Salerni *et al.*, 2002) ou negativa (Laganà *et al.*, 2002) na diversidade macrofúngica, ao contrário do número de carpóforos que surge como estando sempre positivamente correlacionado com este factor climático (Eveling *et al.*, 1990; Laganà *et al.*, 2002; Salerni *et al.*, 2002). Segundo alguns autores, o excesso de precipitação pode ser inibidor da frutificação de algumas espécies, em especial das micorrízicas e húmicas (Laganà *et al.*, 2002), ao baixar a temperatura do solo (Eveling *et al.*, 1990).

Quando a precipitação total e o número de espécies e de carpóforos recolhidos no soto, no decurso dos quatro anos em que decorreu o estudo, foram correlacionados pela determinação dos coeficientes de *Spearman*, evidenciou-se que a precipitação total constitui um parâmetro determinante na frutificação dos macrofungos. A abundância e número de espécies, em especial das não micorrízicas, está positivamente correlacionada com a precipitação total, sugerindo uma acção favorecedora na frutificação macrofúngica. No caso dos fungos micorrízicos, a precipitação total mostrou ter uma menor influência, o que está de acordo com diversos autores ao sugerirem que a sua ocorrência depende também do estado fisiológico do hospedeiro ao qual se associam (Brundrett *et al.*, 1996).

Para além de ser influenciada pela precipitação, no presente trabalho foi igualmente evidenciado que a frutificação das espécies macrofúngicas é influenciada pelo número de dias em que ocorreu a precipitação até à data de colheita, tal como já tinha sido reportado por outros autores (Laganà *et al.*, 2002; Salerni *et al.*, 2002). No caso dos macrofungos micorrízicos a precipitação acumulada que ocorreu 30 dias antes da colheita foi a que favoreceu o aparecimento de um maior número de espécies e de carpóforos; enquanto que nos não micorrízicos tal situação foi observada com precipitações acumuladas correspondentes a 3 dias antes da colheita. A maior rapidez da resposta dos fungos não micorrízicos relativamente aos micorrízicos, às mudanças climáticas, pode ser devido ao facto de os primeiros ocuparem preferencialmente estratos mais superficiais do solo (Salerni *et al.*, 2002).

A temperatura mostrou ter uma menor influência na frutificação dos macrofungos que a precipitação, apresentando coeficientes de *Spearman* mais reduzidos (a variar entre 0,16 e 0,13) na correlação estabelecida entre a temperatura (média, mínima, máxima) e o número de espécies e de carpóforos recolhidos no souto, no decurso dos quatro anos em que ocorreu o estudo. Esta correlação foi verificada com os valores de temperatura registados 3 dias antes da colheita, não tendo sido observada qualquer relação com intervalos de tempo superiores. A menor influência da temperatura, comparativamente à precipitação, na frutificação de macrofungos tinha sido anteriormente verificada por diversos autores (Eveling *et al.*, 1990; Laganà *et al.*, 2002; Salerni *et al.*, 2002). Outros autores constataram que, apesar de ser pouco influente, a temperatura possui um efeito inibitório na frutificação das espécies macrofúngicas, quer fossem micorrízicas ou não micorrízicas (Laganà *et al.*, 2002; Salerni *et al.*, 2002).

Esta contrariedade de respostas dos macrofungos, à precipitação e à temperatura, resulta de na sua frutificação se encontrarem envolvidos uma grande diversidade de parâmetros (Eveling *et al.*, 1990). Este facto levou alguns autores a sugerirem que a frutificação de macrofungos possa ser um processo variável de região para região, não sendo por isso correcto a extrapolação destes resultados, para regiões diferentes daquelas em que se efectuou o estudo (O'Dell *et al.*, 1999).

### ***Produção de macrofungos no souto estudado***

A colheita de todas as espécies macrofúngicas, realizada durante o presente estudo, correspondeu a uma produção total de 67,6 kg de peso seco por hectare, sendo as espécies mais produtoras *Lactarius piperatus* (11,0 kg ps/ha), *Russula delica* (8,0 kg ps/ha) e *Boletus edulis* (6,2 kg ps/ha). Estas espécies, apesar de não terem sido as mais abundantes, foram as que mais contribuíram para a produção total de macrofungos, devido às elevadas dimensões que os carpóforos normalmente exibem.

Para além do número de espécies e de carpóforos colhidos, também a produção total de macrofungos decresceu ao longo dos anos (44,0 kg ps/ha em 2002, 17,1 kg ps/ha em 2003, 4,3 kg ps/ha em 2004 e 2,3 kg ps/ha em 2005) o que, à semelhança do referido anteriormente, poderá estar relacionado com as baixas precipitações registadas durante 2004 e 2005. Esta hipótese é reforçada pelos resultados referidos por Azevedo (1989) que mostram a existência de uma correlação entre as precipitações acumuladas e

a produção total de macrofungos, num souto localizado na mesma região que o aqui estudado.

Com excepção de 2004, a maior produção de macrofungos foi sempre registada na época de frutificação do Outono, resultado este espectável por coincidir com o período no qual se observou um maior número de espécies e de carpóforos. Em 2004, foram produzidos 2,5 kg ps/ha na época de frutificação da Primavera em comparação com a produção 1,8 kg ps/ha obtida na época de Outono. Nesse ano, a ligeira superioridade do número de carpóforos registado na época da Primavera (107 exemplares) em relação ao Outono (104 exemplares) poderá explicar, em parte, as diferenças observadas ao nível da produção macrofúngica. No entanto, o facto da maioria das espécies que frutificaram nesta Primavera apresentarem dimensões superiores (*B. aereus*, *L. piperatus*, *R. cyanoxantha*, *R. risigalina*) comparativamente às com ocorrência no Outono, parece ser a causa mais provável para a elevada produção obtida na primeira época de frutificação.

### ***Exploração do souto na produção de cogumelos comestíveis***

Na última década, tem-se assistido no nordeste transmontano a uma intensificação da colheita e comercialização de cogumelos silvestres comestíveis, sendo uma importante fonte de rendimento para as populações rurais (Cano, 2002; Baptista *et al.*, 2003; Rodrigues, 2005; Cristóvão & Baptista, 2006; Garcia *et al.*, 2006). Muitas famílias interrompem a sua actividade profissional, durante a época de frutificação dos macrofungos, para se dedicarem exclusivamente à sua colheita e venda. Apesar desta actividade ser notória, o processo de colheita e comercialização de macrofungos é, em grande parte, desconhecido não obedecendo a regras nem critérios definidos. As vendas são efectuadas a intermediários responsáveis pela distribuição desta mercadoria, maioritariamente, para países como Espanha, França e Itália (Baptista *et al.*, 2003; Branco, 2003; Cristóvão & Baptista, 2006). Na região não existem, ainda empresas de comercialização e transformação, encontrando-se em Sátão (Viseu) a empresa portuguesa mais próxima. No lado espanhol a oferta é mais variável existindo, na zona de Alcanices (província de Zamora), seis unidades que se dedicam ao comércio e processamento de cogumelos silvestres. Começa também a ser visível a integração dos cogumelos silvestres transmontanos noutras actividades económicas da região,

nomeadamente na restauração, existindo alguns restaurantes que os incluem nos seus menus (Cristóvão & Baptista, 2006).

A colheita de cogumelos silvestres na região transmontana tem incidido num número restrito de espécies, sendo feita de forma muito intensiva e sem qualquer tipo de regulamentação e controlo das quantidades transaccionadas. Esta situação poderá pôr em risco a sobrevivência das espécies recolhidas e ameaçar a própria economia dos agregados que se dedicam a esta actividade (Rodrigues, 2005; Cristóvão & Baptista, 2006). Apesar da grande diversidade de cogumelos existentes na região, os colectores, apenas procedem à colheita de algumas espécies, nomeadamente de *Amanita caesarea*, várias espécies do género *Boletus* (*B. edulis*, *B. aereus*, *B. pinicola*, *B. aestivalis*), *Cantharellus cibarius*, *Lactarius deliciosus*, e em menor número *Morchella conica*, *Hydnum rufescens*, *Tricholoma portentosum* e *Calocybe gambosa* (Cano, 2002; Rodrigues, 2005; Garcia *et al.*, 2006). A maioria destes macrofungos são micorrizicos de castanheiro, carvalho e pinheiro, que constituem as principais espécies agroflorestais do nordeste transmontano.

Das 36 espécies macrofúngicas comestíveis colhidas no souto estudado, que perfazem 63% do total de espécies identificadas, foram registadas algumas com elevada valorização gastronómica, como *A. caesarea*, *B. edulis*, *B. aereus*, *C. cibarius*, *H. rufescens* e *C. gambosa*. Estas espécies são umas das mais valorizadas nos mercados nacionais, com preços de venda<sup>1</sup> que podem atingir os 10-15 €/kg ou mesmo 60 €/kg (no caso de *C. gambosa*, que constitui a espécie mais cotada encontrada neste souto) (Garcia *et al.*, 2006). Vários estudos têm mostrado que o rendimento de soutos e de castiçais decorrentes da exploração do fruto e da madeira de castanheiro, associada à exploração de cogumelos, pode ser particularmente importante na economia agroflorestal (Ana-Magán & Fernández, 2000; Baptista *et al.*, 2003). No souto, a que se reporta o presente estudo, foi verificado que através da colheita e comercialização das espécies macrofúngicas comestíveis, sobretudo das que apresentam mercados bem estabelecidos na região, era possível aumentar o rendimento decorrente da exploração de fruto em 507,2 € por hectare e por ano (Baptista *et al.*, 2003).

---

<sup>1</sup> Preços praticados em 2003



## **CAPÍTULO 4**

**Estudo da Interacção:**

*Pisolithus tinctorius – Hypholoma fasciculare*



## 4.1 INTRODUÇÃO

Numa comunidade biológica, a interação entre os diferentes organismos que a compõem é um fenómeno constante, com consequências ao nível da sua organização. Duas espécies em coexistência, permanente ou temporária, podem interagir de diferentes maneiras, tendo sido as várias formas classificadas em (i) interações positivas, quando ocorre o benefício mútuo para ambos os seres vivos, ou para apenas um deles, sem o prejuízo do outro, (ii) interações negativas quando surge prejuízo para ambos ou para um dos organismos interagentes em benefício do outro, e por fim (iii) interações onde nenhuma das duas espécies interagentes é afectada (neutralismo). Todas estas formas de interação podem ocorrer entre indivíduos da mesma espécie, interações intra-específicas, ou então entre indivíduos de espécies diferentes, interações inter-específicas. Na tabela 4.1 são apresentados os principais tipos de interação que podem operar numa comunidade biológica.

**Tabela 4.1** Tipos de interação entre duas espécies e suas características.

Tipos de interação	Espécie		Características da interação
	A	B	
<b>Neutralismo</b>	0	0	Nenhuma das duas espécies afecta a outra
<b>Interações negativas</b>			
Competição	-	-	Ambas as espécies são atingidas negativamente, porque a sua competição por um determinado recurso leva à exaustão do mesmo
Amensalismo (antibiose e alelopatia)	0	-	Secreção pela espécie A de substâncias nocivas à espécie B
Parasitismo	+	-	A espécie A (parasita) requer a presença da espécie B (hospedeiro) prejudicando-a
Predação	+	-	A espécie A (predador) consome a espécie B (presa)
<b>Interações positivas</b>			
Comensalismo	+	0	A espécie A (comensal) beneficia da presença da espécie B, que não é afectada
Protocooperação	+	+	As duas espécies favorecem-se mutuamente, mas sobrevivem sem a presença da outra
Mutualismo	+	+	As duas espécies favorecem-se mutuamente e requerem a presença da outra

0 a espécie não é afectada pela presença da outra  
 + a espécie é beneficiada ou requer a presença da outra  
 - a espécie é prejudicada pela presença da outra

#### 4.1.1 Tipos de interação em fungos saprófitas-lenhícolas

Ao nível da comunidade macrofúngica saprófita-lenhícola, é possível observar todos os tipos de interação descritos na tabela 4.1, sendo a competição o tipo de interação mais comum que ocorre ao nível deste grupo trófico (Boddy, 2000). A definição de competição é controversa, estando descritas diferentes definições, que reflectem o ênfase colocado nos mecanismos de interação competitiva, nas respostas das populações a testes experimentais, ou em qualquer outro aspecto particular. A definição geralmente aceite, proposta por Keddy (1989), refere que existe competição entre dois organismos sempre que um deles exerça um efeito negativo sobre outro, quer consumindo quer controlando o acesso a um recurso cuja disponibilidade é limitada. Este tipo de interação favorece um processo selectivo que culmina, geralmente, com a preservação das formas de vida melhor adaptadas ao meio ambiente, e com a extinção de indivíduos com baixo poder adaptativo, constituindo, assim, um factor regulador da densidade populacional. No que refere à competição, podem definir-se dois tipos: a competição por interferência e a competição por exploração (Keddy, 1989). Na competição por interferência (ou directa) um organismo exclui directamente um outro da disponibilidade de um recurso geralmente através de agressão (física ou química); enquanto que na competição por exploração (ou indirecta), um organismo utiliza um recurso tornando-o indisponível ou diminuindo a sua disponibilidade para outros organismos.

A competição ao nível dos fungos saprófitas-lenhícolas pode ocorrer em duas fases distintas, de acordo com o estado de colonização do recurso. Na primeira fase, designada por captação primária do recurso, a competição ocorre pela obtenção de recursos não colonizados por outras espécies fúngicas, enquanto que na segunda fase, designada por captação secundária do recurso, ocorre competição pela obtenção de recursos já colonizados por outras espécies fúngicas (Boddy, 2000). O sucesso da primeira fase de competição depende de vários factores, como a eficaz dispersão de esporos e sua rápida germinação, taxa de crescimento do micélio e capacidade do fungo em utilizar compostos orgânicos disponíveis no substrato não-colonizado. Na segunda fase de competição, a conquista, a manutenção e a defesa do recurso é feito por intermédio de mecanismos antagonistas desenvolvidos pelo fungo. Estes mecanismos podem operar à distância (antagonismo à distância) ou após contacto, resultando em reacções tais como “interferência de hifas” e parasitismo (micoparasitismo). Aquando

do estabelecimento do contacto entre fungos opositores, o resultado da interação pode ser a substituição total ou parcial do micélio de uma das espécies fúngicas, sendo que um fungo invasor ganha o território do fungo opositor. Alternativamente, o fungo invasor consegue crescer sobre ou através do micélio opositor, não ocorrendo ocupação do território do fungo opositor (Boddy, 2000).

### ***Mecanismos antagonistas desenvolvidos por fungos saprófitas-lenhícolas***

No **antagonismo à distância**, a inibição de crescimento do fungo opositor ocorre na ausência, ou previamente, ao estabelecimento de contacto físico das hifas fúngicas interactuantes. Este tipo de antagonismo é usualmente atribuído à produção de compostos voláteis e/ou difusíveis, tais como antibióticos (Boddy, 2000). Por vezes estão ainda envolvidos metabolitos ou enzimas extracelulares (Heilmann-Clausen & Boddy, 2005). Neste tipo de antagonismo, as reacções são muito variáveis de acordo com a combinação de espécies fúngicas. No entanto, as reacções mais vulgares correspondem à degeneração das hifas ou à sua substituição pelo micélio da espécie interactuante (Boddy, 2000).

O mecanismo de “**interferência de hifas**” ocorre quando uma hifa estabelece contacto com uma outra hifa ou esporo da espécie interactuante, resultando na morte desta como consequência de uma série programada de eventos de destruição citoplasmática (Boddy, 2000; Woods *et al.*, 2005). Este tipo de antagonismo é um dos mais vulgares ao nível dos basidiomicetos saprófitas-lenhícolas, sendo a espécie *Phlebiopsis gigantea* a mais estudada devido à sua larga aplicação como agente biológico no controlo de *Heterobasidion annosum* (Pratt *et al.*, 1999; Vainio *et al.*, 2001; Annesi *et al.*, 2005). O mecanismo de “interferência de hifas” não está perfeitamente esclarecido, mas é referido como sendo mediado pela produção de metabolitos difusíveis, não-enzimáticos, secretados apenas quando as hifas interactuantes estabelecem contacto (Boddy, 2000).

O **micoparasitismo** é um mecanismo antagonista definido quando um fungo parasita outro. De acordo com a definição geral de parasita, o fungo parasita obtém nutrientes a partir do outro fungo (hospedeiro) com quem vive em íntima associação. A obtenção de nutrientes pode ocorrer após a morte das células do hospedeiro (parasita necrotrófico) ou então a partir das células vivas do hospedeiro (parasita biotrófico).

Apesar de nem sempre se verificar em todas as interações fungo parasita - fungo hospedeiro, o processo de micoparasitismo envolve as seguintes etapas: a percepção do hospedeiro; o crescimento do parasita em direção ao hospedeiro; o contacto e reconhecimento do hospedeiro; a adesão e penetração do fungo parasita no hospedeiro (Whipps, 2001). Após reconhecimento, as hifas parasitas aderem e enrolam-se progressivamente sobre a superfície das hifas hospedeiras, acabando por penetrá-las e crescer no seu interior. Nalguns casos é possível observar estrangulamento das hifas hospedeiras devido ao forte enrolamento das hifas parasitas (Boddy, 2000). A penetração das hifas parasitas nas células hospedeiras é normalmente mediada pela produção de várias enzimas extracelulares, tais como  $\beta$ -1,3 glucanases, quitinases, celulases e proteases (Whipps, 2001). A actividade antagonista de micoparasitas pode igualmente estar associada à produção de antibióticos, toxinas e de outras  $\beta$ -glucanases, em quantidades que causam a morte ou a destruição dos seus hospedeiro (Inglis & Kawchuk, 2002; Bara *et al.*, 2003; Aggarwal *et al.*, 2004). Em macrofungos saprófitas-lenhícolas somente foram relatadas algumas situações de micoparasitismo de *Lenzites betulina* e de *Pseudotremetes gibbosa* sobre várias espécies de *Coriolus* e de *Bjerkandera*, respectivamente (Rayner *et al.*, 1987). Nestes casos, o parasitismo observado não tem funções exclusivas ao nível da nutrição do fungo parasita, mas facilita ao fungo micoparasita a posse da área de crescimento ocupada pelo fungo hospedeiro na madeira. Após a total colonização do substrato, o fungo parasita passa a nutrir-se pela decomposição da madeira, utilizando outros mecanismos de interação antagónica como forma de manutenção e de defesa do recurso ocupado (Rayner *et al.*, 1987).

Para além do mecanismo de interferência e micoparasitismo, que pressupõem um contacto físico entre os fungos opositores, ainda existe um outro tipo de antagonismo que ocorre por **contacto micelial**, constituindo o mecanismo de antagonismo de maior relevância ao nível dos fungos saprófitas-lenhícolas. Este tipo de antagonismo ocorre após estabelecimento de contacto de micélios de duas espécies fúngicas, resultando em alterações morfológicas nos fungos interactuantes. De uma maneira geral, estas alterações morfológicas, têm como função aumentar a resistência à penetração do micélio do fungo invasor ou possibilitar o crescimento micelial sobre ou através da colónia fúngica opositora (Dowson *et al.*, 1988c). Estas alterações morfológicas podem incluir especificamente (i) a formação de micélio denso que constitua uma “barreira”

que impeça a invasão do fungo interactuante, (ii) a formação de um micélio “invasivo” pela criação de várias frentes de crescimento, (iii) a formação de um micélio com crescimento aéreo, e (iv) a formação de cordões miceliais ou de estruturas rizomórficas (Dowson *et al.*, 1988c; Boddy, 2000; Donnelly & Boddy, 2001; Wald *et al.*, 2004; Woods *et al.*, 2005). Estas alterações são normalmente acompanhadas por uma redistribuição do micélio, que passa a apresentar-se menos denso nas zonas distais à zona de interacção, tornando a colónia susceptível ao fungo invasor no caso de ocorrência de fragmentação da zona de interacção (Boddy, 2000). É igualmente frequente ocorrer a produção intra- e intercelular de pigmentos (Donnelly & Boddy, 2001). Nalgumas interacções estabelecidas entre fungos que formam cordões miceliais, pode ocorrer a descoloração e a indução de uma resposta lítica, num ou em ambos os segmentos dos cordões miceliais (Dowson *et al.*, 1988c). Esta resposta micelial foi designada pelos autores como “interferência de micélios” devido à sua semelhança com a resposta do mecanismo de antagonismo de “interferência de hifas”.

#### 4.1.2 Factores que afectam a interacção entre fungos

O efeito da interacção entre fungos depende de múltiplas variáveis, tais como (i) factores abióticos, nomeadamente temperatura do substrato, pH, potencial hídrico, pressão atmosférica de CO<sub>2</sub>; (ii) estado fisiológico/nutricional das espécies fúngicas interactuantes; (iii) presença de uma terceira espécie fúngica; e o mais importante (iv) natureza intrínseca das espécies, ou seja a sua combatividade/ agressividade (Boddy, 2000; Wald *et al.*, 2004; Cano & Bago, 2005).

Inúmeros estudos têm vindo a ser realizados de modo a avaliar o efeito de factores abióticos no estabelecimento da interacção entre fungos, verificando-se que podem condicionar o crescimento de um dos fungos interactuantes em favorecimento do outro fungo. Tem sido demonstrado que o crescimento da maioria das espécies saprófitas-lenhícolas é afectado pelo potencial hídrico, cessando o seu crescimento quando este apresenta valores abaixo dos -4,4 MPa (Boddy, 2000; Wald *et al.*, 2004). A actividade antagonica, de diversas espécies de basidiomicetos que formam cordões miceliais, tem sido descrita como ficando seriamente comprometida quando os níveis de CO<sub>2</sub> são elevados e os de O<sub>2</sub> baixos (Chapela *et al.*, 1988). A temperatura e o pH do substrato parecem igualmente influenciar a forma e a taxa de crescimento dos fungos

saprófitas-lenhícolas, com consequências ao nível do efeito da interação (Schoeman *et al.*, 1996; Wald *et al.*, 2004). Enquanto que alguns fungos crescem bem aos 30°C, outros fungos conseguem crescer quando a temperatura é de -18°C (Yakovlev *et al.*, 2000; Wald *et al.*, 2004). A maioria dos fungos saprófitas-lenhícolas promove alterações drásticas do pH do meio de cultura, baixando os seus valores iniciais (Wald *et al.*, 2004).

A disponibilidade de nutrientes para ambas as espécies fúngicas influencia a interação estabelecida, por determinar directamente o estado nutricional dos fungos interactuantes (Holmer & Stenlid, 1997; Boddy, 2000; Wells & Boddy, 2002; Wald *et al.*, 2004). De uma maneira geral, os fungos que ocupam um maior volume de substrato possuem uma maior capacidade combativa em relação aos fungos que ocupam volumes de substrato inferiores (Zakaria & Boddy, 2002; Wald *et al.*, 2004). O substrato onde é efectuado o crescimento de ambos os fungos também interfere na interação estabelecida, tendo sido verificado que a interação observada em solo nem sempre é idêntica à verificada noutra substrato diferente, por exemplo em madeira, para a mesma combinação fúngica (Wells & Boddy, 2002). De facto, a maioria dos estudos da interação entre espécies fúngicas saprófitas-lenhícolas é realizada em condições axénicas, recorrendo a crescimentos efectuados em meios de cultura. Apesar dos resultados fornecerem informações importantes, a sua extrapolação directa para as condições naturais de campo deve ser feita com muito cuidado e com alguma reserva, uma vez que os resultados obtidos nem sempre são coincidentes com o obtido em substrato natural (Dowson *et al.*, 1988c).

A presença de uma terceira espécie fúngica, pode alterar a resposta da interação por um efeito indirecto da interação ou pela modificação da interação (Boddy, 2000). As modificações na interação reportam sobretudo a situações onde a presença de uma terceira espécie fúngica pode modificar a resposta da interação, previamente observada para duas espécies fúngicas. Por exemplo, o fungo *Poria placenta* quando cultivado em agar substitui *Coniophora marmorata*, *C. marmorata* substitui o fungo imperfeito *Paecilomyces variotii* e *P. placenta* substitui *P. variotii* (White *et al.*, 1998). Quando as três espécies estivessem em interação, a extrapolação destes resultados sugeria que *P. variotii* era substituído por *C. marmorata*, que por sua vez era também substituído por *P. placenta*. Contudo, na prática, este resultado não se verificou, sugerindo que a resposta da interação entre duas espécies não pode ser extrapolada para interações

com três espécies, uma vez que a presença desta terceira espécie pode alterar a resposta da interação.

De entre os factores que influenciam a interação entre duas espécies fúngicas, a combatividade/agressividade de ambas as espécies interactuantes é que determina o tipo de interação estabelecido. Existem alguns fungos que são inaptos no ataque e na defesa de um recurso, enquanto que outros o fazem de um modo bastante eficaz. Existem ainda outros que são eficazes no ataque mas inabilitados na defesa, enquanto que outros apesar de apresentarem más características para o ataque podem ser excelentes na defesa do recurso que ocupam. Esta multiplicidade de respostas da interação entre diferentes espécies de fungos saprófitas-lenhícolas permitiu efectuar a hierarquização das espécies relativamente à sua combatividade (Boddy, 2000). Nesta hierarquização foi tido em conta o efeito da combatividade contra outros fungos (por exemplo, indisponibilizando recursos) e também o nível da resposta de combatividade (por exemplo, na defesa do recurso ocupado face a fungos invasores).

#### **4.1.3 Efeito das interações fúngicas negativas na comunidade biótica**

Embora as interações positivas sejam tão importantes na comunidade biótica como são as interações negativas, tem sido dedicado mais esforço a compreender o efeito das últimas comparativamente às primeiras. As interações inter-específicas nos fungos saprófitas-lenhícolas não são excepção.

Apesar de poucos trabalhos reportarem o efeito da interação antagonista com fungos saprófitas-lenhícolas na translocação de nutrientes, algumas evidências sugerem a translocação de macronutrientes (carbono e de fósforo) entre os fungos interactuantes, tendo sido igualmente verificada a perda de nutrientes na zona de interação (Boddy, 2000; Wells & Boddy, 2002). De facto, o notável padrão de crescimento de fungos saprófitas formadores de cordões miceliais, capazes de colonizar extensas áreas, faz com que estes fungos tenham um papel importante na mobilização e na translocação de biomassa e de nutrientes nos ecossistemas naturais (Wells & Boddy, 2002).

Os fungos saprófitas, em especial os basidiomicetos, exibem diferentes estratégias para a captura de nutrientes, que variam de acordo com a espécie, a quantidade e tipo de recurso disponível (solo ou madeira), o estado nutricional do fungo e a presença de outros organismos no recurso (Dowson *et al.*, 1989; Holmer & Stenlid, 1997; Boddy,

1999). Em estudos de interação com fungos saprófitas-lenhícolas tem sido evidenciada uma redução do crescimento ( $\text{mm dia}^{-1}$ ) e da produção de biomassa ( $\text{mg dia}^{-1}$ ) do micélio devido à presença de outro fungo no mesmo recurso (Donnelly & Boddy, 2001). A superfície ocupada pelos micélios das colónias fúngicas interactuantes revelou ainda alterações na distribuição de um dos micélios que se apresentava menos denso e ramificado.

Durante a interação entre fungos saprófitas-lenhícolas, é provável que ocorram modificações na actividade metabólica dos micélios interactuantes, decorrentes sobretudo da acção defensiva ou combativa contra o fungo opositor (Freitag & Morrell, 1992). Algumas evidências sugerem que a competição entre dois fungos saprófitas esteja associada a custos de energia, ocorrendo frequentemente alterações dos níveis de  $\text{CO}_2$  (aumento ou diminuição) durante as interações antagonistas (Boddy, 2000).

Das interações inter-específicas nos fungos saprófitas-lenhícolas podem ser assim distinguidas repercussões negativas, não só ao nível da composição da comunidade fúngica, mas também ao nível do seu funcionamento. Neste último caso, os efeitos observados podem ocorrer no padrão de crescimento e distribuição dos respectivos micélios, na translocação de nutrientes num mesmo micélio e para outros organismos (inclusivamente para o fungo opositor) e nas taxas de libertação de  $\text{CO}_2$  (respiração) (Boddy, 2000). A competição entre fungos saprófitas-lenhícolas constitui, assim, um dos mais importantes reguladores da densidade populacional e/ou da estrutura final da comunidade (i.e. abundância relativa de cada espécie na comunidade).

#### **4.1.4 Aplicação da interação: controlo biológico de doenças**

Uma estratégia que tem vindo a ser utilizada para o controlo de determinadas doenças ou pragas consiste no controlo biológico, onde é utilizado um organismo (predador, parasita ou patógeno) que ataca um outro prejudicial a culturas de interesse. O incremento dos custos do controlo químico, a perda de eficiência de alguns dos produtos utilizados, os problemas ao nível da intoxicação do homem e dos animais e os problemas ambientais advindos destas práticas, promoveram a procura de alternativas para o controlo de fungos patogénicos. A utilização de microrganismos antagonistas como agentes biológicos apresenta potencialidades para (i) a limitação da actividade de patógenos, pela utilização de diversos mecanismos (dos quais se destacam o

micoparasitismo, a produção de antibióticos ou de enzimas, e a competição por nutrientes), ou (ii) o aumento da resistência do hospedeiro, estimulando os seus mecanismos de defesa e/ou produção de metabolitos tóxicos (Brimner & Boland, 2003).

De entre os fungos filamentosos, as espécies pertencentes ao género *Trichoderma* são reconhecidamente os microrganismos antagonistas mais utilizados no controlo biológico, sendo por essa razão uns dos mais estudados. Estes fungos saprófitas têm sido frequentemente utilizados no controlo biológico de patógenos radiculares, tais como *Rizoctonia solani*, *Sclerotium* spp., *Fusarium* spp. e *Armillaria* spp., e de patógenos da parte aérea, como por exemplo *Venturia* spp., *Botrytis* spp. e *Pyrenophora tritici-repentis* (Calistru *et al.*, 1997; Inglis & Kawchuk, 2002; Perelló *et al.*, 2003). O seu modo de acção é variado podendo o seu mecanismo de antagonismo ser por parasitismo (Lu *et al.*, 2004), pela produção de metabolitos voláteis e não voláteis (antibióticos, enzimas) (Inglis & Kawchuk, 2002; Wiest *et al.*, 2002; Reithner *et al.*, 2005) ou pela competição por nutrientes, espaço e oxigénio (Brimner & Boland, 2003).

A elevada agressividade exibida pela maioria dos fungos saprófitas-lenhícolas sugere a sua utilização, como agentes biológicos, no controlo de patógenos. Um exemplo de sucesso é a utilização do fungo *Phlebiopsis (Peniophora) gigantea* na prevenção da colonização das superfícies de corte (feridas) em troncos de pinheiro (*Pinus* spp.) ou de abeto (*Picea abies*) pelo fungo patógeno *Heterobasidion annosum* (Pratt *et al.*, 1999; Vainio *et al.*, 2001; Annesi *et al.*, 2005). A acção do fungo *P. gigantea* deriva sobretudo da sua elevada taxa de crescimento nestes tecidos competindo, desta forma, com o agente patógeno pelo mesmo recurso por intermédio do mecanismo de antagonismo “interferência de hifas” (Boddy, 2000; Woods *et al.*, 2006). Os fungos saprófitas-lenhícolas formadores de cordões miceliais, por exibirem elevada agressividade, têm sido igualmente utilizados no controlo biológico de determinados agentes patógenos. De entre estes, destacam-se as espécies *Hypholoma fasciculare*, *Hypholoma australe*, *Phanerochaete filamentosa*, *Phanerochaete velutina*, *Coriolus versicolor*, *Stereum hirsutum*, *Ganoderma lucidum*, *Schizophyllum commune* e *Xylaria hypoxylon* no controlo biológico de *Armillaria* spp., um patógeno radicular que ataca diversas espécies florestais e fruteiras, e algumas plantas herbáceas, nas regiões temperadas e tropicais (Pearce & Malajczuk, 1990; Pearce *et al.*, 1995; Chapman *et al.*, 2004; Cox & Scherm, 2006). Apesar da maioria destes trabalhos de antagonismo ter

sido efectuada em condições laboratoriais, alguns casos de sucesso de controlo biológico de *Armillaria* spp. em condições de campo têm sido referidos. De entre estes, destaca-se a redução significativa da taxa de mortalidade de plantas atribuída a *Armillaria ostoyae*, três a cinco anos após inoculação com o fungo *H. fasciculare* (Chapman *et al.*, 2004). Resultados semelhantes foram obtidos com outras espécies fúngicas, nomeadamente *Hypholoma australe* e *Phanerochaete filamentosa*, cuja inoculação juntamente com um tratamento químico com sulfamato de amónio, reduziu significativamente a colonização de plantas pelo fungo patogénico *Armillaria luteobubalina* (Pearce *et al.*, 1995). O mecanismo de antagonismo adoptado por estes agentes biológicos é normalmente ao nível da “interferência de hifas”, caracterizado pela cessação de crescimento do fungo patogénico como resultado da vacuolização, granulação e lise das hifas (Cox & Scherm, 2006). Para além do controlo da *Armillaria*, alguns fungos saprófitas formadores de cordões miceliais, têm demonstrado exercer um efeito antagonista, em condições laboratoriais ou de campo, contra o fungo patogénico *Heterobasidion annosum* que ataca sobretudo as raízes e o colo da maioria das coníferas (Nicolotti & Varese, 1996; Woods *et al.*, 2006). De entre estes, destacam-se as espécies *H. fasciculare*, *P. velutina*, *Verticillium bulbillosum* (Nicolotti & Varese, 1996) e *Resinicium bicolor* (Woods *et al.*, 2006).

#### **4.1.5 *Pisolithus tinctorius* e *Hypholoma fasciculare*: duas espécies fúngicas presentes em soutos**

De entre a comunidade fúngica do solo, existente no souto transmontano estudado neste trabalho (Capítulo 3), destaca-se a presença de fungos saprófitas, que enquanto decompositores contribuem para o funcionamento dos ecossistemas; e os fungos ectomicorrízicos, que para além de desempenharem um papel importante no ciclo de nutrientes no solo, estão intimamente envolvidos na nutrição mineral das plantas com as quais se associam (Fitter & Garbaye, 1994; Cairney & Meharg, 2002). No souto estudado foram registados exemplares de *Pisolithus tinctorius*, os quais desempenham um papel benéfico para *Castanea sativa* (Martins *et al.*, 1997; Martins, 2004), assim como exemplares de *Hypholoma fasciculare* (Capítulo 3). A interação entre estes dois fungos, e em geral entre fungos saprófitas e ectomicorrízicos, nunca foi estabelecida. Este aspecto reveste-se, no entanto, de elevada importância uma vez que poderá ter

repercussões quer ao nível da composição da comunidade fúngica, mas também ao nível do seu funcionamento, nomeadamente na translocação de nutrientes (Boddy, 2000), com consequências importantes no seio da comunidade vegetal (crescimento e sanidade das plantas) (El-Shatnawi & Makhadmeh, 2001).

### ***Pisolithus tinctorius***

O fungo *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch (= *P. arhizus*) (Kirk *et al.*, 2001) é uma espécie ectomicorrízica com uma vasta distribuição geográfica, formando associações simbióticas com mais de 20 géneros de espécies vegetais hospedeiras (Cairney & Chambers, 1997). Os carpóforos surgem frequentemente ao longo de bordaduras dos povoamentos com os quais o fungo se encontra associado e ao longo dos caminhos rurais. Encontra-se durante todo o Outono e princípios de Inverno, mais raramente na Primavera, no solo de qualquer tipo de formação arbórea: pinheiro, eucalipto, carvalho, castanheiro, entre outros. Várias evidências têm indicado este fungo como sendo um colonizador primário (Gardner & Malajczuk, 1988) apresentando, no entanto, baixa acção competitiva contra outras espécies fúngicas ectomicorrízicas (Marx *et al.*, 1984; McAfee & Fortin, 1986). A ocorrência desta espécie foi já descrita em, pelo menos, 33 países (Martins, 2004), encontrando-se frequentemente em locais com condições ambientais adversas, como sejam ambientes resultantes de actividades de mineração (Marx, 1977) ou em solos erodidos (Valdez, 1986), solos com acidez extrema, secos e com baixa fertilidade (Cairney & Chambers, 1997), suportando também altas temperaturas (Martins, 2004). Este aspecto pode justificar a persistência de utilização de *P. tinctorius* em programas de florestação com plantas micorrizadas, em solos sujeitos a stresses edáficos (Cairney & Chambers, 1997). De facto, a facilidade de crescimento desta espécie em cultura *in vitro* tem impulsionado a sua utilização em programas de florestação, tendo vindo a ser desenvolvidos inúmeros protocolos de inoculação de plantas com esta espécie fúngica (Cairney & Chambers, 1997). A inoculação controlada tem igualmente permitido estudar diversos aspectos morfológicos e fisiológicos, decorrentes do processo de micorrização com *P. tinctorius*. De entre os sistemas micorrízicos estudados destaca-se a interacção *P. tinctorius* - *Eucalyptus globulus*, sendo inclusivamente considerada como a simbiose ectomicorrízica “modelo” (Cairney & Chambers, 1997). A micorrização de *C. sativa* por *P. tinctorius* também se

encontra descrita, tanto em plantas micropropagadas como em germinantes, com efeitos sobretudo ao nível do aumento das taxas de crescimento das plantas (Martins *et al.*, 1996; Martins, 2004).

Segundo Kirk *et al.* (2001), o fungo *Pisolithus tinctorius* inclui-se nos seguintes grupos taxonómicos:

Reino: Fungi

Filo: Basidiomycota

Classe: Basidiomycetes

Sub-classe: Agaricomycetidae

Ordem: Boletales

Família: Sclerodermataceae

Género: *Pisolithus*

Espécie: *Pisolithus tinctorius*

### ***Hypholoma fasciculare***

O fungo *Hypholoma fasciculare* (Huds.) P. Kumm. (= *Naematoloma fasciculare*=*Nematoloma fasciculare*) (Kirk *et al.*, 2001) é uma espécie descrita como saprófita-lenhícola, apresentando por vezes comportamentos de parasita, os quais ainda requerem confirmação. É uma espécie que apresenta uma vasta distribuição geográfica, ocorrendo em vários *habitats*, incluindo florestas tropicais, temperadas e boreais (Boddy, 1999). Os carpóforos surgem em tufos cespitosos, sobretudo sobre tocos de caducifólias, durante todo o Outono e princípios de Inverno, e na Primavera. O crescimento micelial deste fungo caracteriza-se morfológicamente pela formação de cordões, que são agregados de hifas alinhadas longitudinalmente (Boddy, 1999). Esta característica particular, associada à sua elevada taxa de crescimento micelial, permite-lhes ocupar extensas áreas que podem atingir mais de 100 m de diâmetro (Boddy, 1993), com repercussões ao nível da mobilização e translocação de biomassa e de nutrientes, sobretudo nos ecossistemas florestais (Wells & Boddy, 2002). O fungo *H. fasciculare*, à semelhança de outras espécies fúngicas cujo micélio forma cordões, é apontado como sendo um colonizador secundário em madeira de árvores de gimnospermas e de angiospermas (Dowson *et al.*, 1988c; Holmer & Stenlid, 1997), apresentando capacidade em manter o domínio ocupado por muitos anos (Pearce *et al.*,

1995). Embora seja preferencialmente um colonizador de pedaços de madeira de grandes dimensões, pode também encontrar-se associado à decomposição de folhas e de pequenos ramos (Dowson *et al.*, 1988c). Trata-se de uma espécie muito combativa contra outras espécies saprófitas, capazes ou não de formarem cordões miceliais (Dowson *et al.*, 1988c; Donnelly & Boddy, 2001). Este último aspecto tem incentivado, nos últimos anos, a sua utilização como agente biológico contra fungos patogénicos, sendo o exemplo mais comum a sua utilização no controlo de doenças de apodrecimento de raízes causadas por *Armillaria* spp. (Chapman *et al.*, 2004) e *H. annosum* (Nicolotti & Varese, 1996). O fungo *H. fasciculare* também tem sido descrito como interactuante com alguns microartrópodes do solo, nomeadamente algumas espécies de colêmbolas como *Folsomia candida*, *Proisotoma minuta* e *Hypogastrura* cf. *tullbergi* (Kampichler *et al.*, 2004). A sua reconhecida acção antagonista contra outros microrganismos tem incentivado a realização de vários estudos que visam conhecer as estratégias de crescimento adoptadas por este fungo em diversos recursos (tipos de madeira) (Dowson *et al.*, 1989) e também as interações inter-específicas estabelecidas com outras espécies fúngicas, saprófitas ou lenhícolas, presentes no mesmo recurso, assim como as repercussões dessas interações (Dowson *et al.*, 1988c; Dowson *et al.*, 1988a; Dowson *et al.*, 1988b; Nicolotti & Varese, 1996; Donnelly & Boddy, 2001; Wells & Boddy, 2002; Heilmann-Clausen & Boddy, 2005; Woods *et al.*, 2005; Cox & Scherm, 2006; Woods *et al.*, 2006).

Segundo Kirk *et al.* (2001), o fungo *Hypholoma fasciculare* inclui-se nos seguintes grupos taxonómicos:

Reino: Fungi

Filo: Basidiomycota

Classe: Basidiomycetes

Sub-classe: Agaricomycetidae

Ordem: Agaricales

Família: Strophariaceae

Género: *Hypholoma*

Espécie: *Hypholoma fasciculare*

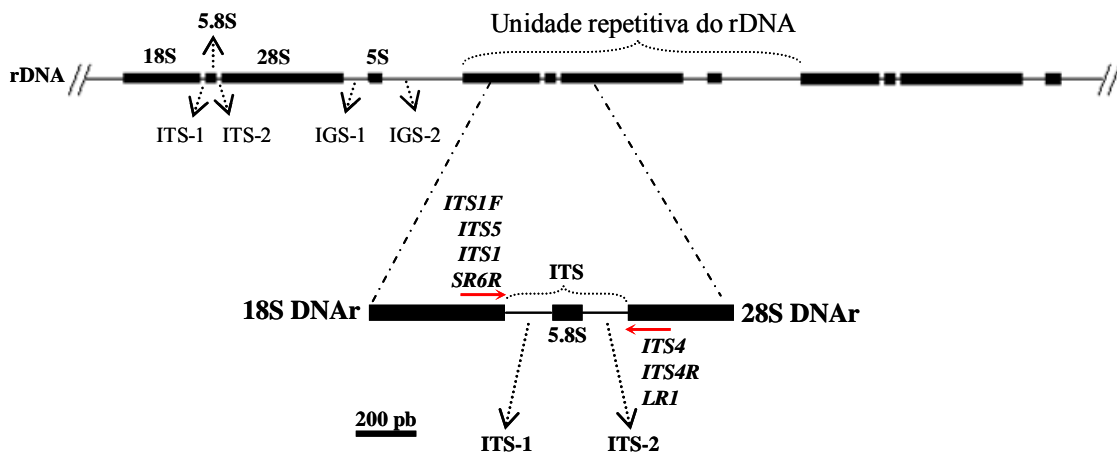
#### 4.1.6 Identificação molecular de fungos

O estudo das comunidades macrofúngicas, em especial de ectomicorrízicas, teve recentemente um impulso significativo com o desenvolvimento e aplicação de métodos moleculares, que permitiram obviar muitos dos problemas inerentes à identificação de espécies pelos métodos convencionais. A metodologia de identificação molecular mais utilizada baseia-se na amplificação, recorrendo à reacção da polimerase em cadeia (PCR), da região do DNA que contém o conjunto de genes que codificam o RNA ribossómico (rRNA), nuclear ou mitocondrial (Buscot *et al.*, 2000; Martin & Rygielwicz, 2005).

Nos organismos eucariotas, o conjunto de genes de rRNA existe em múltiplas cópias (até 200 num genoma haplóide) (Bruns *et al.*, 1991), encontrando-se alinhados em *tandem* em um ou dois cromossomas (Soll, 2000). Cada unidade repetitiva do rDNA é constituída por (i) regiões conservadas, correspondentes aos três genes 18S, 5,8S e 28S (regiões codificantes); (ii) regiões não codificantes, e por isso menos conservadas, que correspondem aos designados espaçadores internos transcritos (ITS); (iii) e espaçadores intergénicos não transcritos (IGS), que separam as diferentes unidades de transcrição (Figura 4.1) (White *et al.*, 1990; Martin & Rygielwicz, 2005). Devido a possuir regiões pouco conservadas entre espécies, a identificação ou estabelecimento de relações filogenéticas em fungos é efectuada recorrendo-se à região ITS, localizada entre os genes 18S e 28S do rRNA e que geralmente inclui também a região codificante do gene 5,8S do rRNA (White *et al.*, 1990; Redecker *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 2001; Diez *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2002; Moyerson *et al.*, 2003; Oda *et al.*, 2004). As diferenças na região ITS são detectadas por sequenciação dos produtos amplificados (Redecker *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 2001; Diez *et al.*, 2001; Moyerson *et al.*, 2003; Oda *et al.*, 2004) ou pela variação dos fragmentos obtidos pela actividade de endonucleases de restrição, pela técnica designada PCR/RFLPs (Anderson *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2002; Martin & Rygielwicz, 2005).

São várias as razões que tornam a região ITS adequada à identificação de fungos: (i) a facilidade de amplificação por PCR desta região, uma vez que na maioria das espécies fúngicas esta região possui um comprimento de 650 a 900 pb; (ii) a existência de múltiplas cópias destas sequências no genoma em análise, permitindo a amplificação a partir de amostras de DNA reduzidas, diluídas ou bastante degradadas; (iii) a existência de um elevado polimorfismo inter-específico nas sequências amplificadas,

sendo a variabilidade intra-específica muito reduzida (Buscot *et al.*, 2000) e, finalmente, (iv) a possibilidade de utilização de iniciadores nucleotídicos universais (White *et al.*, 1990; Gardes & Bruns, 1993; Egger, 1994; Martin & Rygiewicz, 2005). De facto, múltiplos iniciadores oligonucleotídicos têm vindo a ser concebidos para a amplificação desta região, de modo a diferenciar eficazmente as espécies fúngicas (White *et al.*, 1990; Gardes & Bruns, 1993; Egger, 1994; Martin & Rygiewicz, 2005). No entanto, a maioria dos investigadores recorrem frequentemente ao par *ITS1* e *ITS4* ou então *ITS4* e *ITS5* (White *et al.*, 1990; Martin & Rygiewicz, 2005), por permitirem uma maior variabilidade entre espécies.



**Figura 4.1** Representação esquemática da região de rDNA, que contém as unidades repetitivas dos genes que codificam o RNA ribossômico nuclear. A localização dos iniciadores nucleotídicos, vulgarmente utilizados na amplificação da região ITS para identificação molecular fúngica, é igualmente representada. Os rectângulos representam os genes com sequências conservadas, enquanto as linhas representam as regiões espaçadoras mais variáveis. As setas a vermelho indicam os locais de ligação dos iniciadores nucleotídicos e a direcção da polimerização (adaptado de White *et al.*, 1990).

#### 4.1.7 Objectivos

No estudo da comunidade macrofúngica associada a povoamentos de *C. sativa*, no nordeste transmontano, foi evidenciada a presença do fungo *H. fasciculare* pertencente ao grupo trófico dos fungos saprófita-lenhícola (Capítulo 3). O seu isolamento a partir de um carpóforo de *Amanita muscaria* infectado por este fungo saprófita, sugeriu o estabelecimento de uma interação entre estas duas espécies fúngicas. No entanto, apesar de existir uma documentada acção antagonista de *H. fasciculare* contra outras espécies fúngicas saprófitas, lenhícolas e patogénicas, derivado sobretudo da sua

elevada taxa de crescimento, nunca foram reportados efeitos desta espécie sobre a comunidade de espécies ectomicorrízicas. Assim sendo, o presente trabalho teve como objectivo avaliar o potencial mecanismo antagonista do fungo saprófita-lenhícola *H. fasciculare* sobre o fungo ectomicorrízico *P. tinctorius*, em condições *in vitro*. A escolha de *P. tinctorius* deveu-se ao facto (i) de se tratar de um fungo ectomicorrízico, que ocorre naturalmente nos povoamentos de *C. sativa* na região transmontana, (ii) por possuir uma vasta distribuição geográfica, formando associações simbióticas com raízes de mais de 20 géneros de plantas hospedeiras (Cairney & Chambers, 1997), inclusive com o castanheiro (Martins *et al.*, 1996; Martins *et al.*, 1997; Martins, 2004), e (iii) por a micorrização com *P. tinctorius* demonstrar efeitos positivos em plantas de castanheiro (Martins *et al.*, 1996; Martins *et al.*, 1997; Martins, 2004).

Após caracterização morfológica e molecular dos fungos interactuantes (*H. fasciculare* e *P. tinctorius*), o(s) mecanismo(s) antagonista(s) adoptado pelo fungo *H. fasciculare* foi avaliado pelo crescimento radial e análise morfológica (macroscópica e microscópica) das colónias fúngicas interactuantes. Aspectos particulares relacionados com a agressividade de *H. fasciculare* foram igualmente estudados pela avaliação da acidificação do meio de interacção.

Os estudos desenvolvidos permitirão avaliar a interacção estabelecida entre os fungos *H. fasciculare* e *P. tinctorius*, a qual poderá ser relevante para o estabelecimento de medidas que permitam a sobrevivência e a persistência de espécies fúngicas ectomicorrízicas num determinado ecossistema do solo, com consequências ao nível da produtividade agrícola e florestal.

## 4.2 RESULTADOS

### 4.2.1 Aspectos morfológicos de *Pisolithus tinctorius* e *Hypholoma fasciculare*

Os esporocarpos de *Pisolithus tinctorius* desenvolveram-se à superfície do solo do souto, apresentando uma forma globosa, piriforme ou clavada, com cerca de 5-20 cm de altura e 4-10 cm de largura (Figura 4.2). Os carpóforos apresentaram uma cor amarela-acastanhada, por vezes apresentando manchas escuras à superfície. Quando seccionados, os carpóforos revelaram uma massa de esporos (gleba), os quais se encontravam em compartimentos de forma oval ou circular, os peridíolos. Os peridíolos, localizados na metade superior do corpo de frutificação, apresentaram coloração acastanhada devido à maturação dos esporos, enquanto que aqueles contendo esporos em vias de maturação apresentaram cor amarelada. Os carpóforos desta espécie ocorreram predominantemente em solos de soutos adjacentes ao estudado e sujeitos a mobilizações frequentes, tendo sido registados durante ambas as épocas de frutificação, mais raramente na Primavera (Capítulo 3).



**Figura 4.2** Aspecto macroscópico de carpóforos de *Pisolithus tinctorius* inteiros e seccionados. São visíveis a gleba com peridíolos amarelos junto à estipe e amarelos-acastanhados na metade superior do corpo de frutificação.

Os esporocarpos de *Hypholoma fasciculare* desenvolveram-se à superfície do solo do souto estudado, em tufo cespitosos, durante o Outono e princípios de Inverno. Os carpóforos apresentaram um píleo de convexo a hemisférico, passando a aplanado com a maturação (Figura 4.3). O píleo de coloração amarelo-sulfuroso-vivo, exibindo por vezes o vértice alaranjado, apresentou um diâmetro variável de 2 a 6 cm. As lâminas eram apertadas e sinuadas, apresentando uma coloração amarelo-sulfuroso-claro, nos exemplares jovens, e amarelo-esverdeado, nos exemplares mais maduros. O estipe com

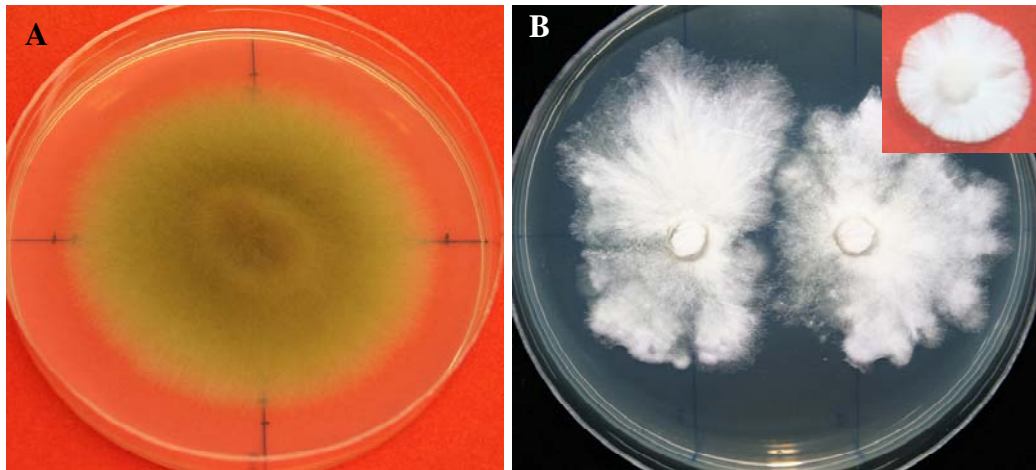
5-12 cm de altura e 3-10 mm de largura, apresenta coloração amarelo-sulfuroso, mais clara ou mais escura, consoante o grau de maturação dos exemplares. Nalguns exemplares foi ainda possível observar uma zona anilhada membranosa. A carne apresentou uma coloração amarelo-sulfuroso, exibindo um aroma agradável e sabor amargo.



**Figura 4.3** Aspecto macroscópico de carpóforos de *Hypholoma fasciculare*, evidenciando o seu aparecimento em tufos cespitosos, junto ao colo de castanheiro (A) e em povoamentos mistos de *Castanea sativa*-*Pinus pinaster* (B).

Quando em crescimento no meio de cultura sólido Melin-Norkrans (pH 6,6), as colónias de *P. tinctorius* apresentaram o micélio com uma coloração amarelo-acastanhado, mais escura no centro (Figura 4.4). Em toda a superfície da colónia observou-se crescimento de micélio aéreo de cor amarelo-acastanhado e com aspecto algodinoso. As margens apresentaram-se regulares. No reverso, a colónia exibe uma coloração amarelo-acastanhado, ligeiramente mais escuro no centro, não evidenciando exsudação de compostos pigmentados para o meio de cultura.

As colónias de *H. fasciculare*, quando cultivadas em meio de cultura sólido Melin-Norkrans (pH 6,6), apresentaram um micélio com coloração branca (Figura 4.4). No decurso do seu crescimento, as colónias revelaram alterações nas suas características morfológicas. No início da inoculação, as colónias apresentaram um crescimento estriado (semelhante a cordões) e com as margens regulares, desenvolvendo depois um micélio muito pruinoso (coberto de uma camada poeirenta ou farinhenta), sobretudo no centro da colónia, e exibindo margens irregulares.

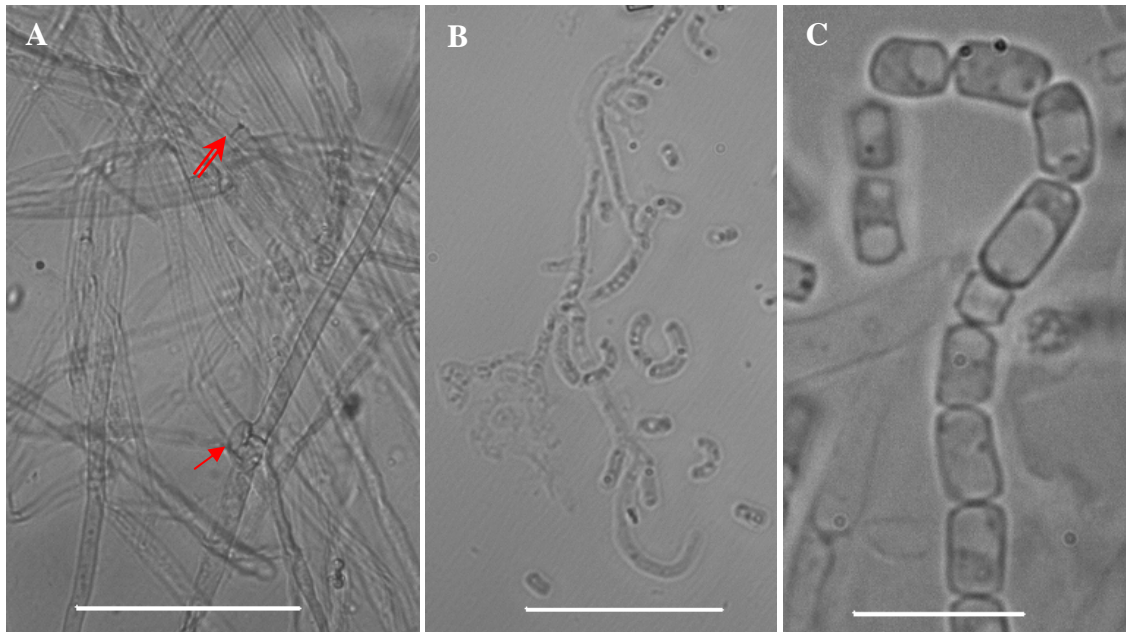


**Figura 4.4** Aspecto macroscópico das colónias de *Pisolithus tinctorius* (A) e de *Hypholoma fasciculare* (B) em meio de cultura sólido Melin-Norkrans (MMN), pH 6,6. Apresentam-se igualmente as diferenças macroscópicas entre as colónias de *H. fasciculare* com 30 (B) e 10 dias (inserto) após inoculação.

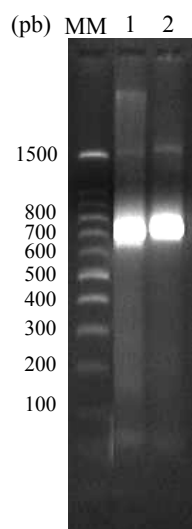
Quando observadas em microscopia óptica, as hifas de *P. tinctorius*, apresentaram-se septadas, com paredes grossas, e com um diâmetro variável de 5,5 a 6,5  $\mu\text{m}$  (Figura 4.5A). Foram igualmente evidenciadas ansas de anastomose, que promovem a ligação entre dois compartimentos contínuos das hifas, de modo a garantir a manutenção do micélio num estado dicariótico aquando da divisão celular. As hifas de *H. fasciculare* apresentaram-se com paredes finas e com um diâmetro regular de cerca de 2,5  $\mu\text{m}$  (Figura 4.5B). Para além de muito mais finas, estas hifas apresentavam-se muito ramificadas. Nas suas extremidades eram visíveis múltiplos artrósporos que se apresentam em forma de cadeia, podendo por vezes observar-se a formação de círculos (Figura 4.5C).

#### 4.2.2 Identificação molecular de *H. fasciculare* e *P. tinctorius*

A identificação molecular do fungo isolado a partir de carpóforos de *Amanita muscaria* e de *P. tinctorius* foi efectuada pela amplificação termocíclica da região ITS do rDNA nuclear, utilizando o par de iniciadores nucleotídicos *ITS5FO* e *ITS4RE*. A amplificação de DNA genómico de ambos os fungos resultou num único fragmento de 700 pb (Figura 4.6). Após reamplificação e purificação, ambos os fragmentos foram sequenciados, utilizando os mesmos iniciadores.



**Figura 4.5** Aspectos microscópicos de *Pisolithus tinctorius* (A) e de *Hypholoma fasciculare* (B, C). A presença de hifas septadas (seta com traço duplo) e de ansas de anastomose (seta com traço simples) está evidenciada em *P. tinctorius* (A) e a formação de artrósporos em *H. fasciculare* (C). Barra 50 $\mu$ m (A, B); 25 $\mu$ m (C).



**Figura 4.6** Análise electroforética dos produtos resultantes da amplificação de DNA genômico de *Hypholoma fasciculare* (1) e *Pisolithus tinctorius* (2), na presença dos iniciadores nucleotídicos *ITS5FO* e *ITS4RE*. A electroforese foi realizada em gel de agarose 1,2% (p/v). MM - marcador de massa molecular (100 pb DNA Ladder).

A sequência nucleotídica correspondente à região ITS do rDNA nuclear do fungo isolado de carpóforos de *Amanita muscaria* encontra-se representada na figura 4.7. Esta

sequência compreende 655 pb e inclui a região ITS1 (com 274 pb) e ITS2 (com 220 pb) e a região codificante correspondente ao gene 5,8S com 161 pb. Ambas as regiões ITS1 e ITS2 não se encontram completas, devido à utilização dos iniciadores *ITS5FO* e *ITS4RE* que não flanqueiam essas regiões na totalidade. Quando efectuada a análise comparativa da sequência nucleotídica obtida com regiões ITS de rDNA de outras espécies fúngicas, foram obtidos valores de identidade de 99,0% com *Hypholoma fasciculare* (nº acesso DQ320134), o que confirmou a identidade do fungo isolado.

```

GAACAAGGTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATAAACCTGGCTTGGTTGATGCTGGTCTTTTCGGAGACATGTGCACACCTTGTCA 100
CTTTATATCTCCACCTGTGCACCTTTGTAGACCTGGATTCAACTTTCCGAGGAACTTGGTTGTGAGGAATTGCTTAATAGGCTTTCTTGTAGTTTC 200
CAGGGCTATGTTTTCATATACACCTTAAGAATGTAACAGAATGTCATTATTAGGCTTAATTGCCTTATAAACTATATACAACCTTCAGCAACGGATCTCT 300
TGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCTCCTT 400
GGTATTCGAGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGTTCATTAAATTCTCAACCTTTTAACTTTTGGTTAGTAAGTGATTGGAAGTGGGGGCATGTTGGTTTT 500
TTCATTGAAATAAACTCCCTGAAATGCATTAGCTGGTTGCCTTGTGCGAACATGTCTATTGGTGTGATAATTATCTACGCCGTGGGCTATTGCCGTTT 600
ATAGCACTGCTTATAATCGTCTGTTTCATTGAGACAATATGACAATTTGACCTC 655

```

**Figura 4.7** Sequência nucleotídica da região ITS do rDNA do fungo isolado a partir de carpóforo de *Amanita muscaria*. A região codificante do gene 5,8S encontra-se sombreada a rosa e as regiões não codificantes ITS1 e ITS2 encontram-se, respectivamente, indicadas com letra azul e verde. Os números à direita referem-se aos nucleótidos.

A sequência nucleotídica correspondente à região ITS do rDNA de *P. tinctorius* encontra-se representada na figura 4.8. A sequência compreende 492 pb e inclui a região ITS1 (com 105 pb) e IST2 (com 225 pb) e a região correspondente ao gene 5,8S com 162 pb. A análise comparativa da sequência nucleotídica com regiões ITS do rDNA de outras espécies fúngicas revelou valores de identidade de 99,0% com o *P. tinctorius* (nº de acesso AF374707), confirmando assim a sua identificação.

O alinhamento das sequências nucleotídicas de *H. fasciculare* e *P. tinctorius* com regiões ITS do rDNA nuclear de outras espécies macrofúngicas mostraram uma elevada conservação na sequência, de cerca de 160 pb, correspondente ao gene 5,8S (Figura 4.9). As regiões não codificantes ITS1 e ITS2 apresentaram-se mais variáveis.

ACACACCTCAGTGCACCCATTGCAAGGGCCCTCGGGACCCGCGGTTTCATCTCCGACTCGCATGTCTACAGAATGTCGATAGCATTGATATATA 100

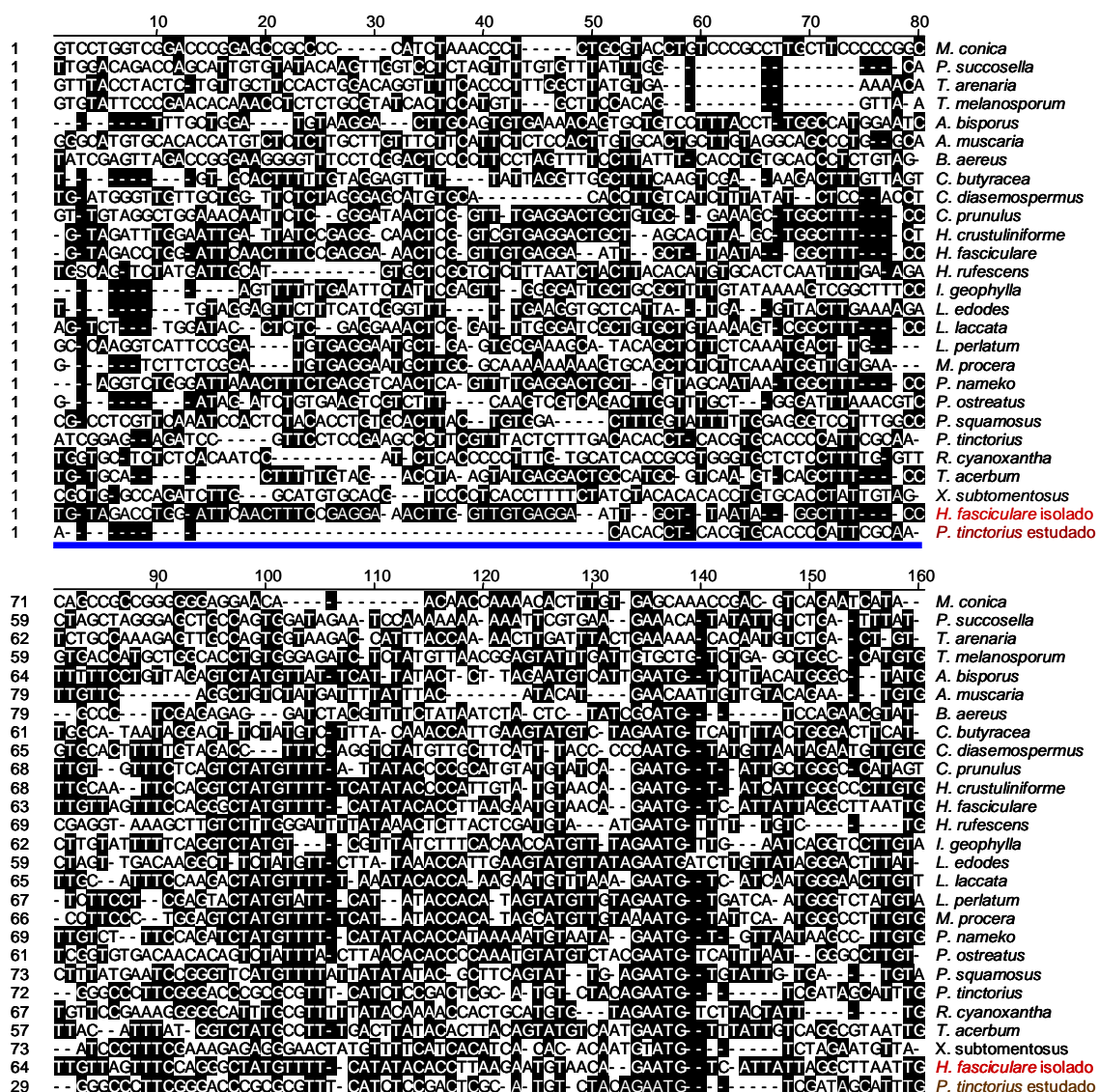
TAAAAAATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATCGCGATAAGTAATGTAATTGCAGATTTCCGTGAAT 200

CATCGAATCTTTGAACGCACCTTCGCGCTCTGGTATTCCGAGGAGCATGCCGTGTTTGTAGTGTACCGAAATCTCAAACCAAGCTTTCTGACTTCGGT 300

CGAAGGCTCGGGTTGGACCGTTGGGAGTCTGCGGGGACGCATGTCTGCGGCTCTCTGAAATGCATTAGCGGTGGGCATGCAAGTCTTGCTTGGCACC 400

AGCCTCTCCGGCGTCATAGTGATCTGCGGGGCTGTCAGACTGCAAGGGACATGTCCCATGCTCTCCAACCTTTGCGAGGCCCTCTCTCGT 492

**Figura 4.8** Sequência nucleotídica da região ITS do rDNA de *Pisolithus tinctorius*. A região codificante do gene 5,8S encontra-se sombreado a rosa e as regiões não codificantes ITS1 e ITS2 encontram-se, respectivamente, indicadas a azul e verde. Os números à direita referem-se aos nucleótidos.



**Figura 4.9** Alinhamento de sequências nucleotídicas, que flanqueiam os iniciadores oligonucleotídicos *ITS5FO* e *ITS4RE*, de diversas espécies de asco- e basidiomicetos. A região codificante do gene 5,8S está indicada com uma linha rosa. As regiões não codificantes ITS1 e ITS2 do rDNA estão indicadas com uma linha azul e verde, respectivamente. As sequências foram alinhadas com o programa *MegAlign* (DNASTAR) utilizando o método Clustal. Os resíduos nucleotídicos conservados encontrados nas sequências analisadas estão sombreados a preto. (ver anexo II para os números de acesso).

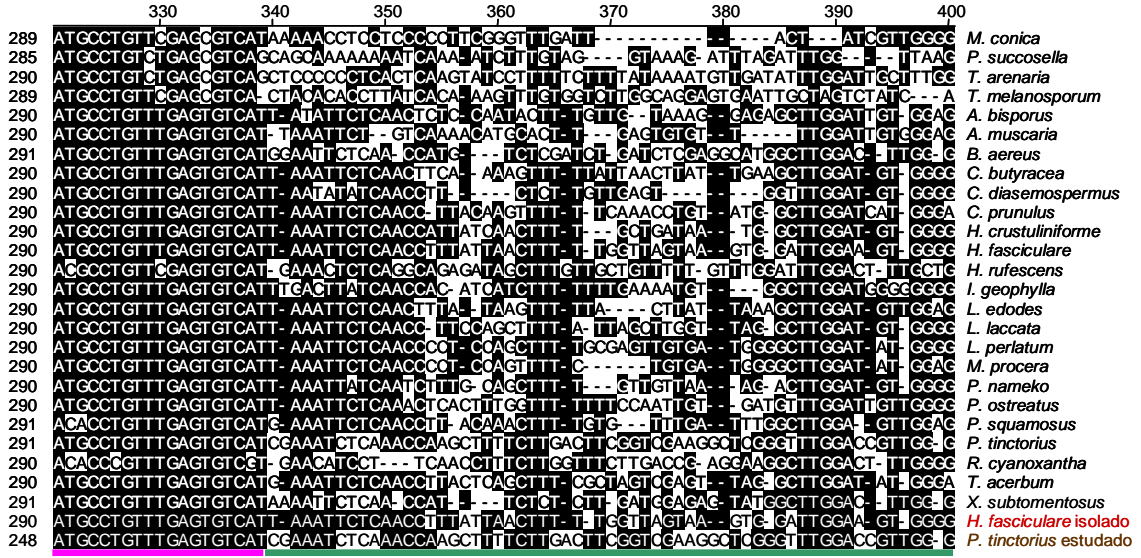
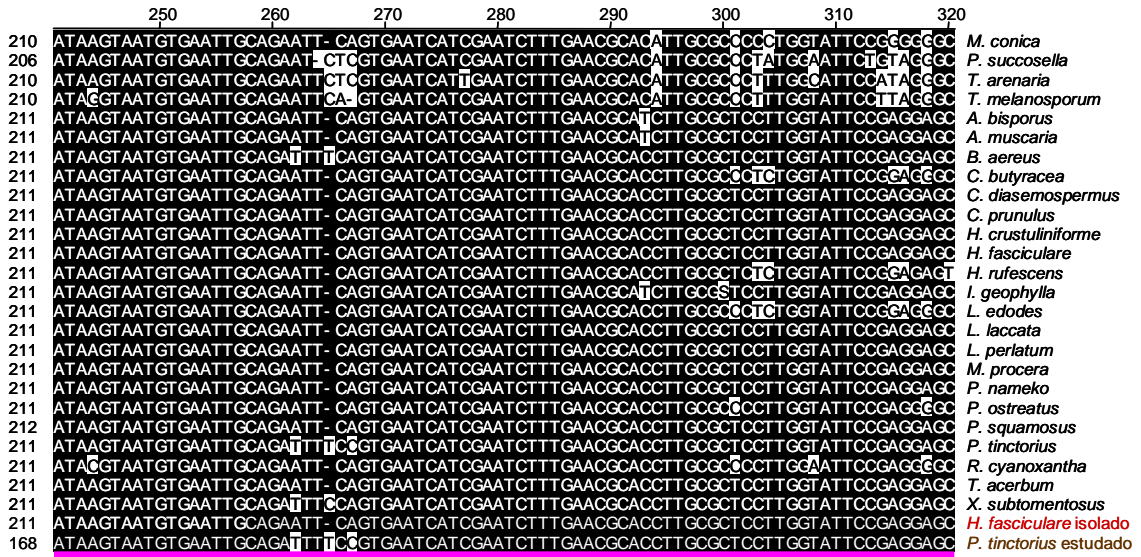
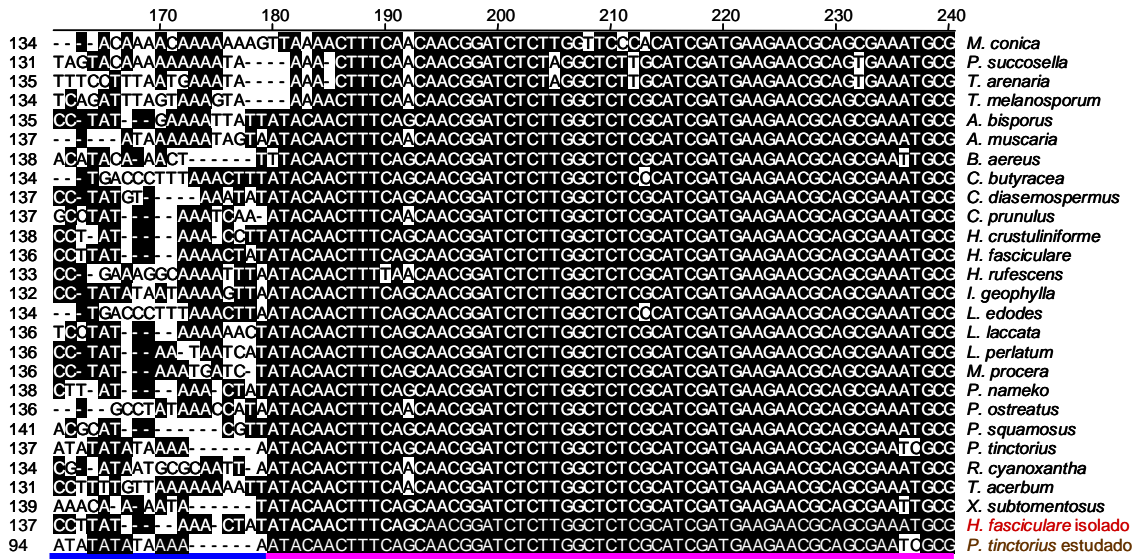


Figura 4.9 Continuação.

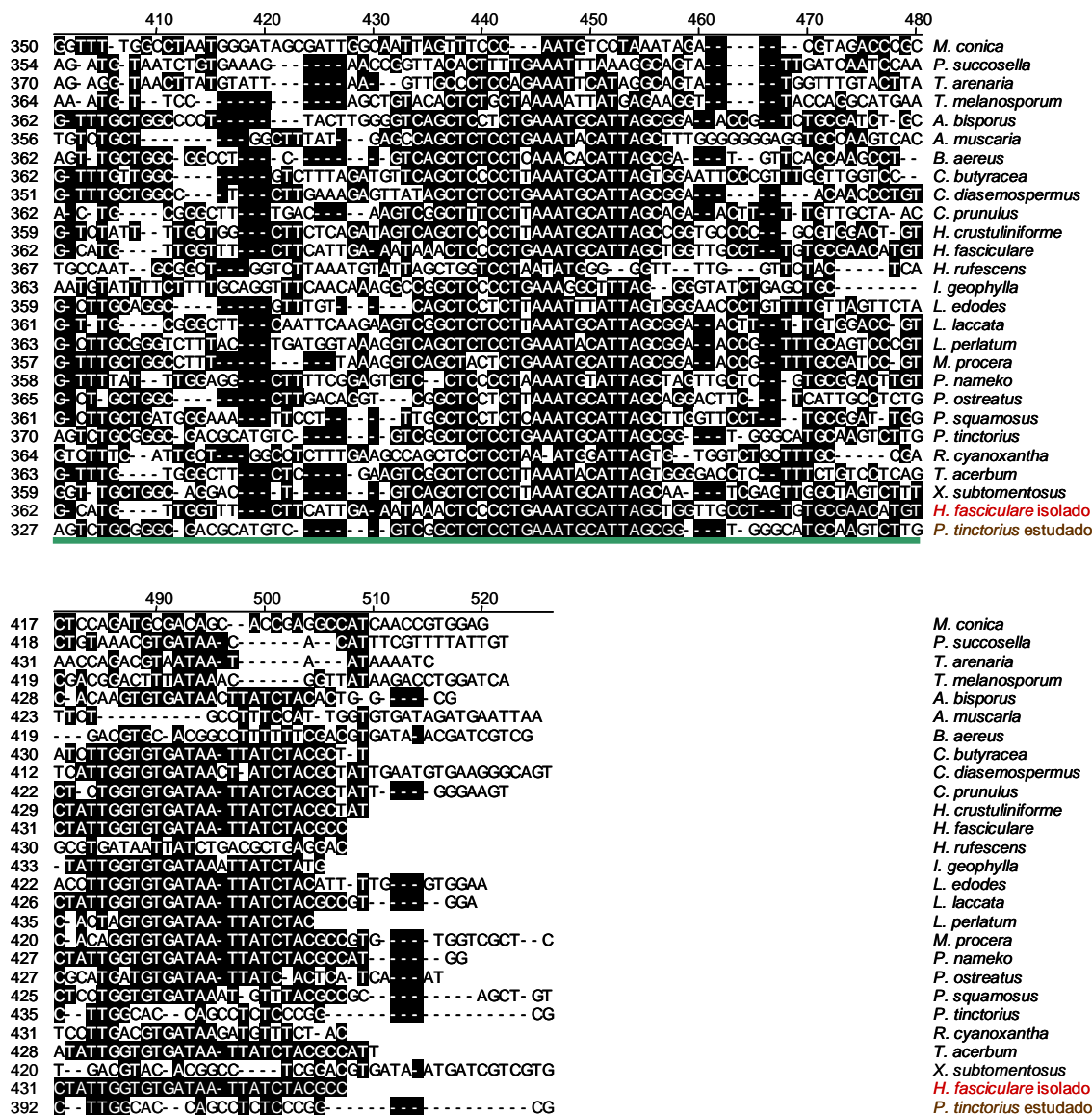
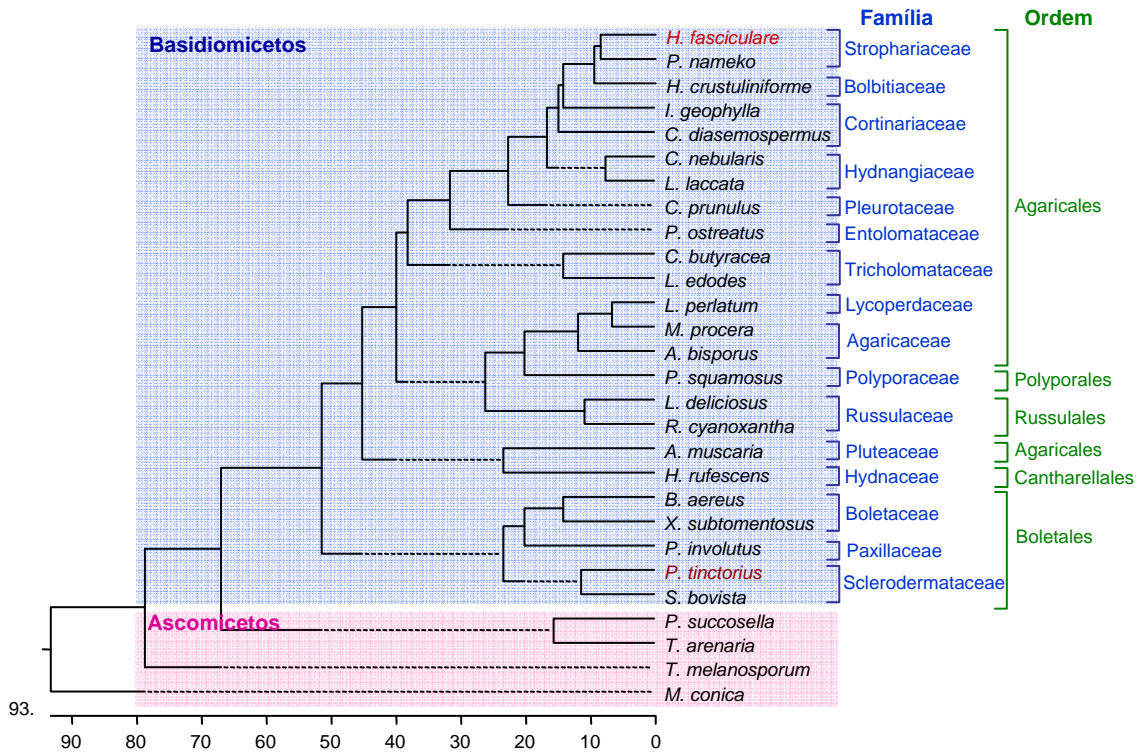


Figura 4.9 Continuação.

A árvore filogenética, construída com base no alinhamento de sequências nucleotídicas correspondentes aos fragmentos de várias espécies macrofúngicas, pertencentes às classes ascomicetos e basidiomicetos, confirmam a classificação de *H. fasciculare* e *P. tinctorius* em grupos taxonômicos distintos (Figura 4.10). Ambas as espécies integram a classe basidiomicetos (sombreada a azul), perfeitamente distinta dos fungos da classe ascomicetos (sombreada a rosa), mas pertencem a ordens distintas. A espécie *H. fasciculare* encontra-se integrada na ordem Agaricales e família Strophariaceae, apresentando-se filogeneticamente muito próxima de outras espécies que integram a mesma ordem e família, como por exemplo com *Pholiota nameko*. A

espécie *P. tinctorius* pertence à ordem Boletales e família Sclerodermataceae. A sua relação filogenética é muito próxima com outras espécies que integram a mesma ordem e família, como por exemplo com *Scleroderma bovista*.



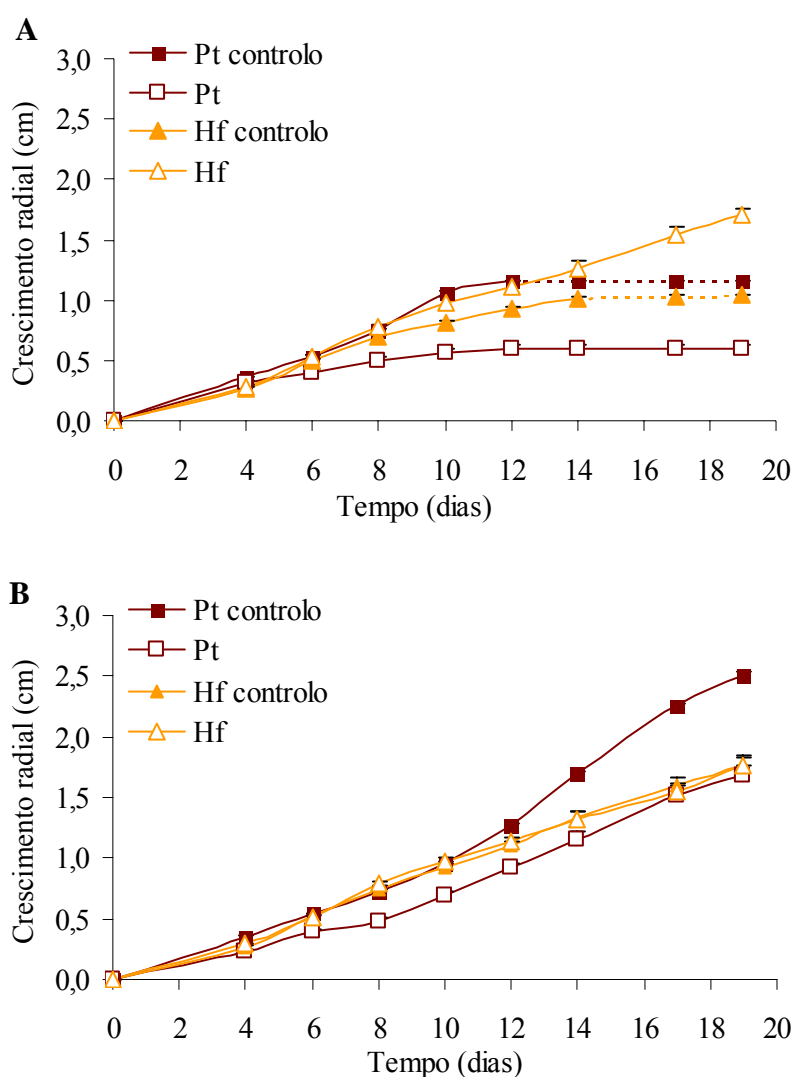
**Figura 4.10** Árvore filogenética representando a relação entre a região ITS do rDNA de *Hypholoma fasciculare* e de *Pisolithus tinctorius* com a de outras espécies de basidiomicetos e ascomicetos. As sequências nucleotídicas foram alinhadas através do programa *MegAlign* (DNASTAR), pelo método de Clustal utilizando a tabela dos pesos residuais PAM250. O comprimento de cada par de ramos representa a distância entre cada par de sequências. A escala que se encontra sob a árvore mede a distância entre as sequências (ver anexo II para os números de acesso).

#### 4.2.3 Efeito da interação *P. tinctorius* - *H. fasciculare* no crescimento micelial

A interação *P. tinctorius*-*H. fasciculare* (Pt-Hf) foi avaliada no que se refere ao crescimento micelial pela determinação dos raios das colónias (interno, na região inter-inóculos e externo, nas regiões diametralmente opostas), ao longo de 19 dias. Como controlo foram efectuadas culturas com dois inóculos da mesma espécie, *P. tinctorius* - *P. tinctorius* (Pt-Pt) e *H. fasciculare* - *H. fasciculare* (Hf-Hf).

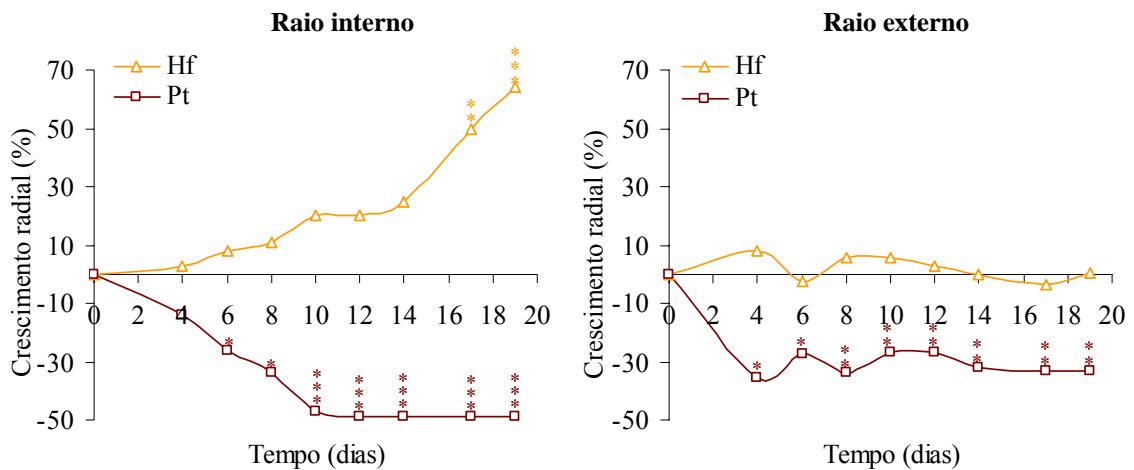
O fungo *H. fasciculare* revelou exercer um efeito inibitório no crescimento de *P. tinctorius* na região inter-inóculos e nas regiões diametralmente opostas (Figura 4.11,

4.12). Ao comparar o crescimento verificado na co-cultura com o fungo interactuante (Pt-Hf) ou com um inóculo da mesma espécie (Pt-Pt), verifica-se que a inibição no crescimento de *P. tinctorius* foi notória logo nos primeiros dias após inoculação, sendo mais evidente na região inter-inóculos que nas regiões diametralmente opostas. De facto, o efeito inibitório no crescimento de *P. tinctorius* foi observado ao fim de 4-6 dias de co-cultura Pt-Hf, com percentagens de redução de crescimento significativas em relação ao controlo Pt-Pt, de 26% (raio interno) e 36% (raio externo).



**Figura 4.11** Crescimento de colónias de *P. tinctorius* e *H. fasciculare* em co-cultura, avaliadas por medição do raio interno, na região inter-inóculos (A) e raio externo, nas regiões diametralmente opostas (B), ao longo de 19 dias após inoculação. As colónias cresceram em co-cultura: *P. tinctorius* (Pt) - *H. fasciculare* (Hf), *P. tinctorius* - *P. tinctorius* (Pt controlo), *H. fasciculare* - *H. fasciculare* (Hf controlo). As linhas a tracejado indicam o momento a partir do qual as colónias interactuantes estabeleceram contacto. A barra indica média  $\pm$  ep (n=6).

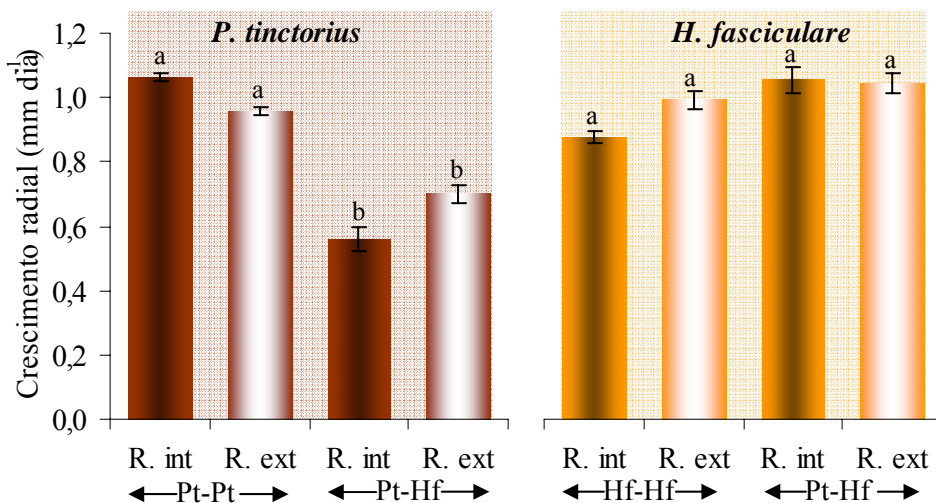
Após este período, as percentagens de redução de crescimento do raio externo de *P. tinctorius* foram praticamente constantes, apresentando valores significativamente diferentes do controlo entre 27% e 34% (Figura 4.12). Pelo contrário, a inibição no crescimento de *P. tinctorius* na região inter-inóculos foi aumentando ao longo do tempo do ensaio, tendo sido observado, ao fim de 12 dias de co-cultura Pt-Hf, um máximo de inibição de crescimento de 49% em relação ao controlo Pt-Pt. De salientar que o efeito inibitório no crescimento de *P. tinctorius* ocorreu muito antes de se ter estabelecido qualquer contacto físico entre as colónias, o qual foi somente observado ao fim de 22 dias de co-cultura.



**Figura 4.12** Diferenças de crescimento percentual, do raio interno e externo de colónias de *H. fasciculare* (Hf) e *P. tinctorius* (Pt) em co-cultura Pt-Hf, em relação a colónias em co-cultura controlo Hf-Hf e Pt-Pt. A existência de diferenças estatísticas relativamente aos respectivos controlos, para o mesmo tempo de interacção, é indicada por \* para  $p < 0,05$ ; \*\* para  $p < 0,01$ ; \*\*\* para  $p < 0,001$ .

Contrariamente ao verificado para *P. tinctorius*, as colónias de *H. fasciculare* exibiram maior crescimento na região inter-inóculos, quando em co-cultura com o *P. tinctorius* (Pt-Hf) do que no controlo (Hf-Hf) (Figura 4.11, 4.12). Após 17 e 19 dias de co-cultura Pt-Hf foram registados aumentos significativos do raio interno das colónias de 50% e 64% em relação ao controlo Hf-Hf, respectivamente. Pelo contrário, não foram registadas diferenças significativas entre o crescimento do raio externo das colónias de *H. fasciculare* quando em cultura com *P. tinctorius* ou com *H. fasciculare*.

Uma vez que se estabeleceu contacto físico entre as colónias de *P. tinctorius*, ao fim de 12 dias de co-cultura Pt-Pt, utilizaram-se os valores de crescimento aos 10 dias de cultura para evidenciar as diferenças de crescimentos de ambos os fungos, nas diferentes condições de crescimento (Figura 4.13). Tal como detectado anteriormente, o fungo *H. fasciculare* reduziu significativamente o crescimento do raio interno (cerca de 47%) e externo (cerca de 27%) de *P. tinctorius* em co-cultura Pt-Hf, quando comparado com o controlo Pt-Pt. Contrariamente, não foram observadas diferenças significativas nas taxas de crescimento do raio interno e externo de *H. fasciculare* quando em cultura com *P. tinctorius* (Pt-Hf) ou com *H. fasciculare* (Hf-Hf). Contudo, nas colónias controlo Hf-Hf a taxa de crescimento do raio interno do fungo foi ligeiramente inferior (em cerca de 13%) face ao raio externo, situação não observável para mesma espécie fúngica em co-cultura Pt-Hf.



**Figura 4.13** Crescimento das colónias de *Pisolithus tinctorius* e *Hypholoma fasciculare* em co-cultura ao fim de 10 dias após inoculação. O crescimento foi avaliado na região inter-inóculo (raio interno - R. int), e na região diametralmente oposta (raio externo - R. ext), em colónias em co-cultura *P. tinctorius* - *P. tinctorius* (Pt-Pt), *P. tinctorius* - *H. fasciculare* (Pt-Hf), *H. fasciculare* - *H. fasciculare* (Hf-Hf). A barra indica média  $\pm$  ep (n=6). Os valores indicados com letras diferentes diferem estatisticamente ao nível de  $p < 0,05$  na mesma espécie fúngica.

#### 4.2.4 Caracterização morfológica das co-culturas

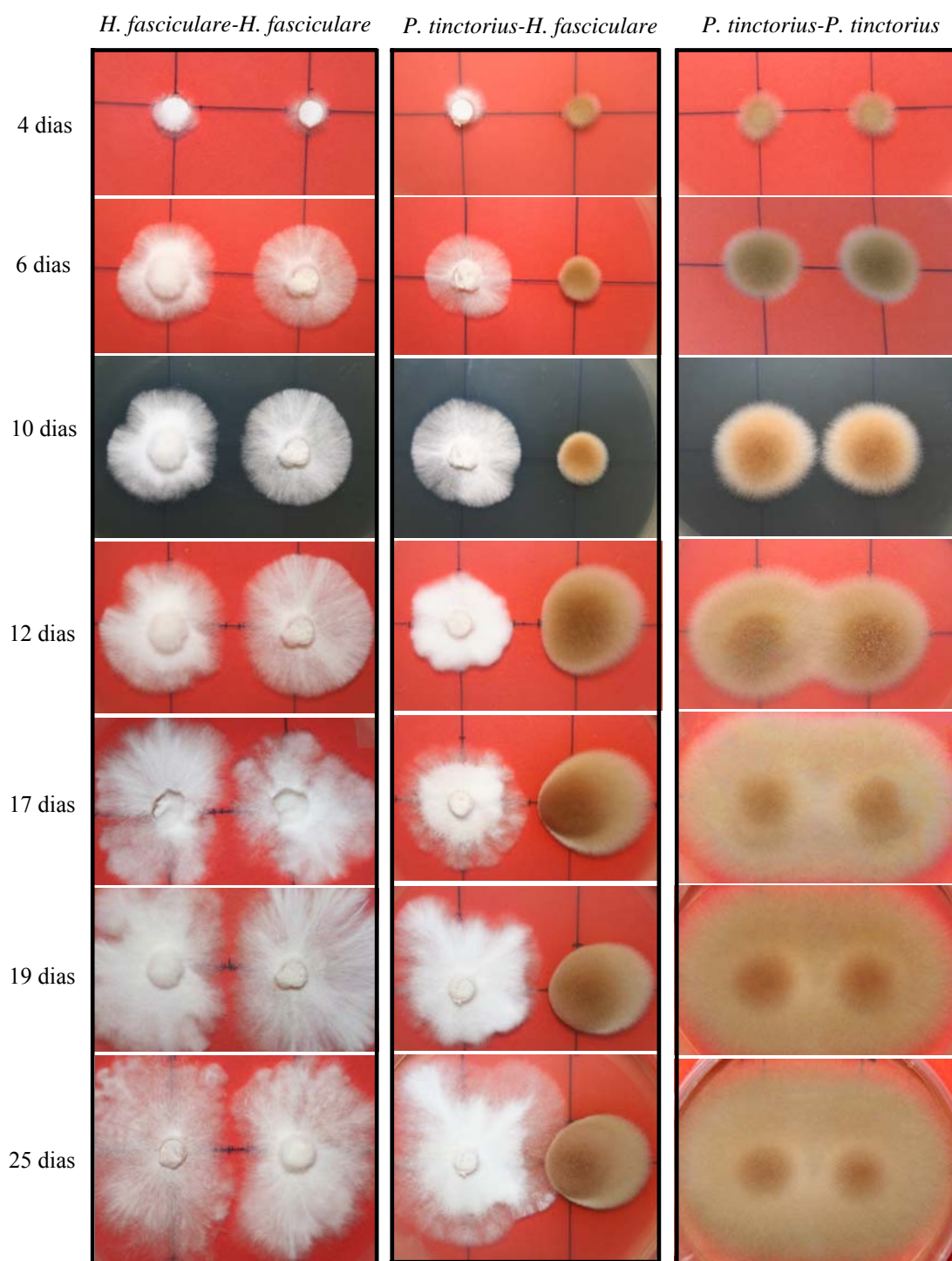
##### *Aspectos macroscópicos*

A caracterização morfológica das co-culturas Pt-Hf e dos controlos Pt-Pt e Hf-Hf foi efectuada macroscopicamente, ao longo de 25 dias de interacção (Figura 4.14). O

fungo *H. fasciculare* apresentou, até aos 12 dias após inoculação, um crescimento radial uniforme em ambos os tipos de ensaio (Pt-Hf e Hf-Hf). Ao fim de 17 dias de co-cultura com *P. tinctorius* (Pt-Hf), as colónias de *H. fasciculare* apresentaram margens irregulares e micélio menos denso. Apesar de também ter sido evidente a formação de margens irregulares no controlo Hf-Hf, a diminuição da densidade do micélio não foi observada. Após o estabelecimento de contacto físico entre as colónias fúngicas na co-cultura Pt-Hf, o micélio de *H. fasciculare* cresceu à volta da colónia de *P. tinctorius*, acabando por envolvê-lo completamente e ocupar toda a superfície do meio de cultura ao fim de 40 dias de co-cultura (resultados não apresentados).

Na presença de *H. fasciculare*, o fungo *P. tinctorius* apresentou desde o início alterações significativas do seu crescimento, quando comparado com o ensaio controlo (Pt-Pt) (Figura 4.14). Apesar de até aos 6 dias de co-cultura Pt-Hf, se ter verificado um crescimento radial e uniforme, verificou-se que o micélio era mais denso e compacto e com menor crescimento aéreo, que nas colónias de *P. tinctorius* em crescimento no ensaio controlo Pt-Pt. Este aspecto foi sobretudo mais notório após os 17 dias de co-cultura Pt-Hf, havendo a clara distinção entre o micélio da região inter-inóculos e da região diametralmente oposta. Verificou-se ainda, ocorrência da produção extracelular de um pigmento acastanhado, que se acumulava sobretudo na zona envolvente das colónias de *P. tinctorius* (pouco evidente na Figura 4.14). A produção deste pigmento foi notória ao fim de 10-12 dias de cultura e intensificou-se ao longo do tempo de interação.

Curiosamente, nos ensaios controlo Pt-Pt e Hf-Hf, foram detectadas diferenças no crescimento das respectivas colónias. Enquanto que no crescimento dos dois inóculos de *P. tinctorius* ocorreu sobreposição dos dois micélios, havendo coalescência das duas colónias após 10 dias de cultura, o micélio de ambas as colónias de *H. fasciculare* nunca se sobrepôs, parecendo evitar ocupar o mesmo espaço de crescimento (Figura 4.14). Este padrão de crescimento no fungo *H. fasciculare* foi mantido durante todo o ensaio verificando-se, ao fim de 40 dias de cultura, a ocupação de toda a superfície do meio de cultura e ausência de sobreposição de micélio de ambas as colónias fúngicas (resultados não apresentados).



**Figura 4.14** Aspecto morfológico das co-culturas estabelecidas entre *H. fasciculare* - *H. fasciculare* (Hf-Hf), *P. tinctorius* - *H. fasciculare* (Pt-Hf) e *P. tinctorius* - *P. tinctorius* (Pt-Pt), no decurso de 25 dias após inoculação.

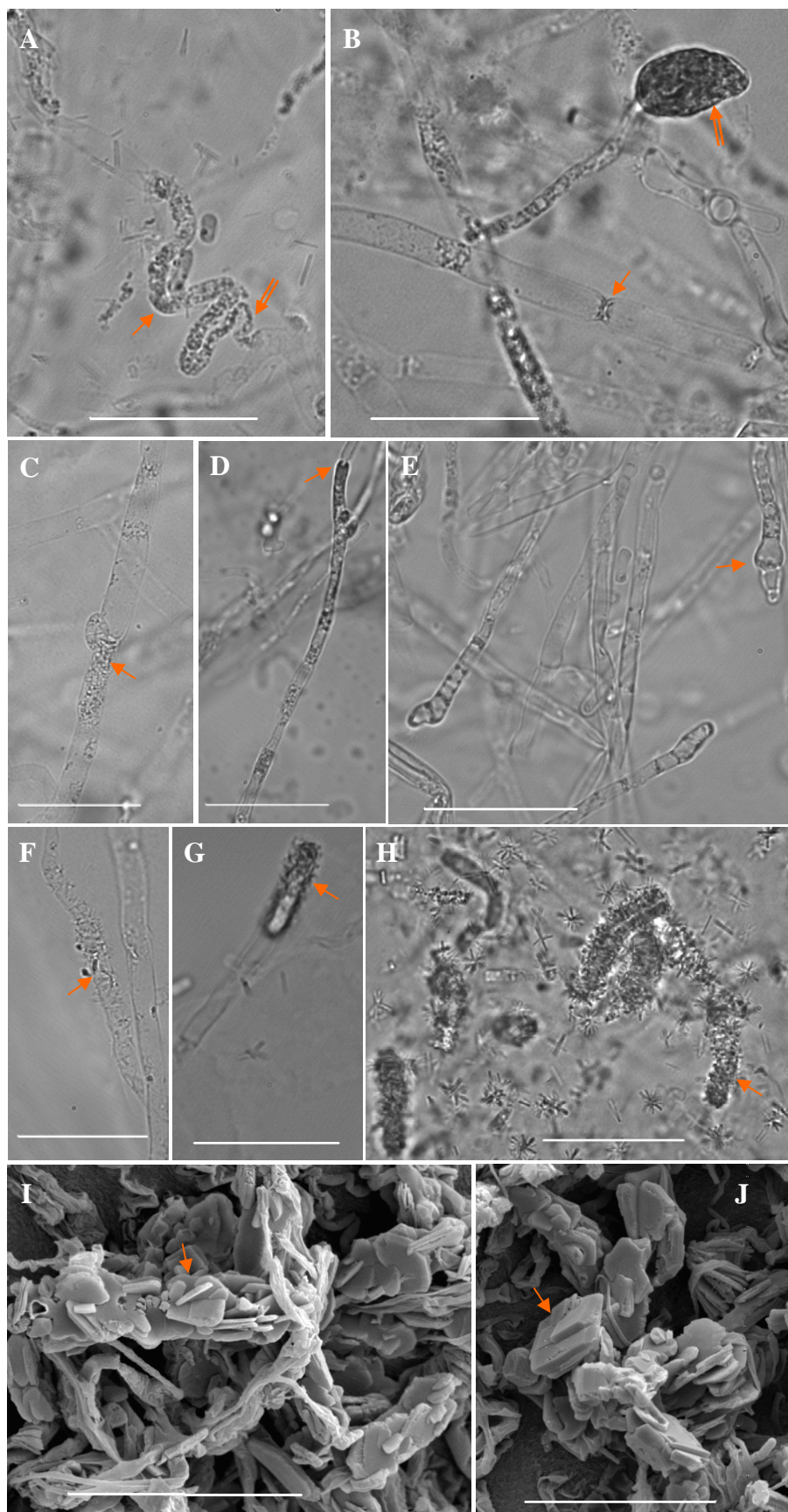
### ***Aspectos microscópicos***

A região de contacto de ambos micélios das co-culturas Pt-Hf e controlos Pt-Pt e Hf-Hf, detectada aos 25 dias de interação, foi observada por microscopia óptica e electrónica de varrimento. Contrariamente ao observado para a zona de contacto das co-culturas controlo Pt-Pt e Hf-Hf, em que não se registaram alterações morfológicas das hifas, na zona de interação da co-cultura Pt-Hf foram evidenciadas drásticas alterações morfológicas (Figura 4.15). As imagens de microscopia óptica revelaram que essas alterações ocorriam somente nas hifas do fungo *P. tinctorius*, cuja identificação se baseou pelo maior diâmetro das suas hifas e pela presença de ansas de anastomose. As alterações mais comuns observadas foram a granulação do protoplasma das hifas (setas simples nas Figuras 4.15A, C), associado frequentemente a um pronunciado colapso das mesmas (seta dupla na Figura 4.15A), restrição das hifas (seta simples na Figura 4.15B), destruição parcial da parede das hifas (seta simples na Figura 4.15D) e ápice das hifas com uma forma atípica (setas simples na Figura 4.15E) ou com a formação de estruturas semelhantes a vesículas (seta dupla na Figura 4.15B).

Na zona de interação Pt-Hf foi ainda observada a presença de um grande número de estruturas cristalinas, que se encontravam fortemente aderentes à superfície das hifas de *P. tinctorius* (setas simples na Figura 4.15F-H). A presença de cristais foi confirmada por microscopia electrónica de varrimento, a qual evidenciou cristais de dimensão variável, apresentando um aspecto laminado e podendo encontrar-se livres, sobrepostos ou incrustados uns nos outros (setas simples na Figura 4.15I, J). O sistema de microanálise por Raio-X por espectroscopia de energia dispersiva, associado ao microscópio electrónico de varrimento, revelou que estes cristais eram compostos por cálcio, sendo muito provavelmente cristais de oxalato de cálcio. Nas co-culturas controlo Pt-Pt e Hf-Hf não foi detectada a presença destes cristais.

#### **4.2.5 Detecção de acidificação do meio de interação**

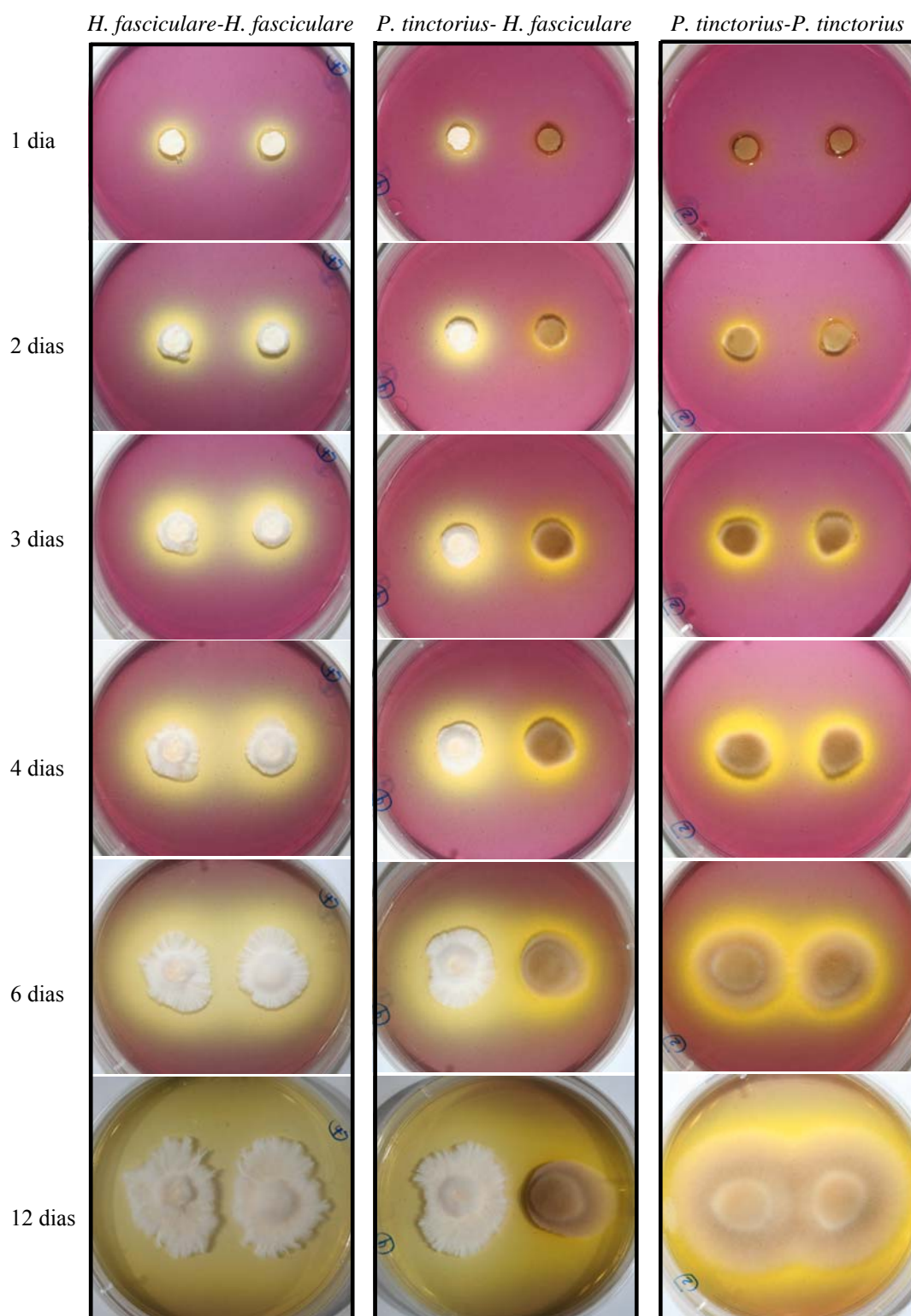
A acidificação do meio de interação das co-culturas Pt-Hf e controlos Pt-Pt e Hf-Hf foi avaliada por alteração de cor do meio de cultura, na presença de azul de bromocresol (indicador de pH), ao longo de 12 dias de co-cultura. Em todos os ensaios



**Figura 4.15** Imagens de microscopia óptica (A-H) e electrónica de varrimento (I, J), na zona de interação entre as colónias de *P. tinctorius* e *H. fasciculare*, ao fim de 25 dias de co-cultura. O significado das setas simples e duplas vem descrito no texto. Barra 25 $\mu$ m (A-H) e 20 $\mu$ m (I, J).

ocorreu a acidificação do meio de cultura, revelado pela alteração da coloração azul-púrpura para amarelo (Figura 4.16). A acidificação do meio de cultura ocorreu logo no início do ensaio, tendo-se observado acidificação da zona de crescimento de *H. fasciculare*, no final de um dia de co-cultura. A acidificação da região de crescimento de *P. tinctorius* foi detectada a partir dos dois dias de co-cultura. Apesar de produzir halos de acidificação de menores dimensões que *H. fasciculare*, as regiões de acidificação correspondentes a *P. tinctorius* apresentavam uma cor amarela mais escura, indicadora de um valor de pH mais reduzido.

A acidificação do meio de cultura foi aumentando com o concomitante crescimento das colónias, apresentando-se praticamente todo o meio de cultura amarelo, ao fim de 12 dias de co-cultura, em todas as combinações fúngicas (Figura 4.16). Quando em cultura dupla Pt-Hf, o contacto dos halos de coloração dos fungos *P. tinctorius* e *H. fasciculare* ocorreu ao fim de 4 dias de interação. Nas co-culturas controlo Pt-Pt e Hf-Hf, o encontro dos halos de coloração ocorreram ao fim de 5 e 3 dias para os fungos *P. tinctorius* e *H. fasciculare*, respectivamente.



**Figura 4.16** Acidificação do meio de cultura promovido pelas co-culturas *H. fasciculare* - *H. fasciculare* (Hf-Hf), *P. tinctorius* - *H. fasciculare* (Pt-Hf) e *P. tinctorius* - *P. tinctorius* (Pt-Pt), ao longo 12 dias de interação. O meio de cultura foi suplementado com azul de bromocresol, permitindo avaliar a acidificação por alteração da coloração de azul-púrpura para amarelo.

### 4.3 DISCUSSÃO

Os microrganismos vivem no solo sob a forma de comunidades complexas, onde tem lugar uma grande variedade de interações. De modo a contribuir para o estudo do efeito da população fúngica saprófita sobre a ectomicorrízica, este trabalho pretende o esclarecimento da interação entre o fungo *H. fasciculare*, descrito como saprófita-lenhícola, e o fungo ectomicorrízico *P. tinctorius*. Apesar de *P. tinctorius* ocorrer com relativa frequência nos sotos transmontanos, tal como evidenciado pela presença de carpóforos desta espécie, para os estudos de interação recorreu-se a um fungo da colecção de Tübingen (Alemanha). O fungo saprófita *Hypholoma fasciculare* foi igualmente detectado no soto transmontano estudado. Neste caso, o fungo utilizado nos estudos de interação correspondeu a um isolado obtido a partir de um carpóforo de *Amanita muscaria*, carecendo a sua identificação de confirmação.

#### **Identificação das espécies *Pisolithus tinctorius* e *Hypholoma fasciculare***

Os fragmentos resultantes da amplificação da região ITS, do fungo de colecção *P. tinctorius* e do isolado de *H. fasciculare*, possuem uma dimensão aproximada de 700 pb, correspondente à gama de dimensões descritas para a maioria das espécies fúngicas (Buscot *et al.*, 2000). O alinhamento das sequências nucleotídicas com as correspondentes regiões ITS de outras espécies macrofúngicas revelou elevada conservação na sequência correspondente ao gene 5,8S (cerca de 160 pb) e uma maior variabilidade nas regiões ITS1 e ITS2. É precisamente esta elevada variabilidade nas sequências ITS, que permite estudos de identificação e de filogenia de espécies fúngicas (White *et al.*, 1990; Henrion *et al.*, 1992; Redecker *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 2001; Diez *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2002; Moyerson *et al.*, 2003; Oda *et al.*, 2004). Adicionalmente, estas regiões caracterizam-se por apresentarem reduzida variabilidade intra-específica o que reforça a sua utilização nestes estudos (Buscot *et al.*, 2000).

A análise comparativa das sequências nucleotídicas correspondentes às regiões ITS do fungo de colecção *P. tinctorius* e do isolado de *H. fasciculare*, com regiões ITS de rDNA de outras espécies fúngicas, permitiu confirmar a identificação destas duas espécies. Para ambas as sequências foram obtidos valores de identidade de 99,0% com a sequência de *P. tinctorius* (nº de acesso AF374707) e de *H. fasciculare* (nº acesso DQ320134), respectivamente. Adicionalmente, a árvore filogenética, construída com

base no alinhamento das sequências nucleotídicas da mesma região ITS de várias espécies de ascomicetos e basidiomicetos, confirmou a classificação de *H. fasciculare* e *P. tinctorius*. Por esta análise, a espécie *H. fasciculare* foi incluída no agrupamento de membros da ordem Agaricales e família Strophariaceae, apresentando-se filogeneticamente relacionada com *Pholiota nameko*, espécie que integra a mesma ordem e família. De igual modo, a espécie *P. tinctorius* agrupou com outras espécies pertencentes à ordem Boletales e família Sclerodermataceae, como é o caso de *Scleroderma bovista*. Apesar desta relação filogenética, alguns autores consideram que *P. tinctorius* pertence a uma nova família, a Pisolithaceae, sendo esta a classificação adoptada no *Index Fungorum* (<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>).

### ***Alterações de crescimento das espécies interaguintes***

O estudo da interação entre o fungo saprófita *H. fasciculare* e o ectomicorrízico *P. tinctorius* foi efectuado recorrendo-se ao método da cultura dupla em condições estéreis (*in vitro*). Neste trabalho, foi utilizado como meio de interação um meio de cultura, mas poderia igualmente ter sido utilizado serrim ou pedaços de madeira estéreis tal como descrito por diversos autores (Dowson *et al.*, 1988c; Nicolotti & Varese, 1996; Woods *et al.*, 2005; Cox & Scherm, 2006; Woods *et al.*, 2006). A inoculação do meio de interação foi efectuada por transferência de inóculos de agar retirados da região periférica de culturas fúngicas em crescimento activo, tal como tem sido descrito para o estudo de interações com fungos saprófitas (Woods *et al.*, 2005; Cox & Scherm, 2006), mas poderiam igualmente ter sido utilizados pedaços de madeira previamente colonizados pelo fungo (Dowson *et al.*, 1988c). Alguns estudos de interação com fungos saprófitas têm igualmente sido efectuados em condições não estéreis, utilizando solo e/ou pedaços de madeira não esterilizados, como meio de interação (Dowson *et al.*, 1988c; Donnelly & Boddy, 2001; Wells & Boddy, 2002). Nestes casos, a inoculação é frequentemente feita pela transferência de inóculos de serrim e/ou de pedaços de madeira, previamente colonizados com os fungos (Dowson *et al.*, 1988c; Donnelly & Boddy, 2001; Wells & Boddy, 2002). Os testes *in vitro*, apesar de práticos, constituem apenas uma primeira abordagem na avaliação da capacidade antagonista de um determinado fungo assim como dos mecanismos antagonistas por ele adoptados. É recomendável que os testes de antagonismo sejam continuados por ensaios realizados sob condições naturais de campo (testes em campo). Estes ensaios podem ser efectuados

sobre o tecido da planta (normalmente superfícies de corte efectuadas nos troncos das árvores) (Woods *et al.*, 2006) ou em solo (Dowson *et al.*, 1988a; Dowson *et al.*, 1988b). Em ambos os casos, a inoculação é normalmente feita pela transferência de inóculos de serrim e/ou de pedaços de madeira, previamente colonizados com os fungos (Dowson *et al.*, 1988a; Dowson *et al.*, 1988b; Woods *et al.*, 2006).

Nas co-culturas *P. tinctorius* - *H. fasciculare* (Pt-Hf) foi evidenciada uma alteração no crescimento de *P. tinctorius*, mas não de *H. fasciculare*, em relação às co-culturas controlo (Hf-Hf, Pt-Pt). De facto, a presença de *H. fasciculare* mostrou um significativo efeito inibitório no crescimento de *P. tinctorius*, observado antes da ocorrência de contacto físico entre as colónias fúngicas. A acção inibitória de fungos saprófitas-lenhícolas no crescimento de algumas espécies fúngicas patogénicas, do solo e de sementes, foi já assinalada em diversos estudos de interacção realizados em cultura dupla (Nicolotti & Varese, 1996; Calistru *et al.*, 1997; Perelló *et al.*, 2003; Aggarwal *et al.*, 2004; Cox & Scherm, 2006). De entre estes, destacam-se algumas espécies pertencentes ao género *Trichoderma* (Nicolotti & Varese, 1996; Calistru *et al.*, 1997; Perelló *et al.*, 2003) e as espécies *Chaetomium globosum* (Aggarwal *et al.*, 2004), *Ganoderma lucidum*, *Schizophyllum commune*, *Xylaria hypoxylon* (Cox & Scherm, 2006), *Hypholoma fasciculare* (Nicolotti & Varese, 1996; Cox & Scherm, 2006), *Verticillium bulbillosum*, *Phanerochaete velutina*, *Mucor hiemalis* e *Phoma fimeti* (Nicolotti & Varese, 1996). No entanto, a acção inibitória de fungos saprófitas-lenhícolas no crescimento de fungos ectomicorrízicos nem sempre se mostrou evidente, podendo ocorrer respostas de interacção contraditórias, dependendo da dimensão do inóculo da espécie fúngica lenhícola utilizada na co-cultura (Lindahl *et al.*, 2001) e da combinação de espécies fúngicas. Por exemplo, recorrendo ao método de cultura dupla *in vitro* em meio de cultura, verificou-se que o fungo saprófita *T. harzianum* inibia o crescimento do fungo ectomicorrízico *L. laccata* (Zadworny *et al.*, 2004), situação que se alterou quando a co-cultura, realizada nas mesmas condições, era estabelecida com o fungo saprófita *Trichoderma virens* (Werner *et al.*, 2002).

Pelo facto da maioria dos estudos de interacção entre espécies saprófitas e ectomicorrízicas serem efectuados em condições *in vitro*, utilizando meios de cultura artificiais, tem sido sugerido que a acção antagonista exibida pelos fungos ectomicorrízicos contra os fungos saprófitas não é evidenciada por se encontrar fortemente relacionada com a deficiência de nutrientes (Werner & Zadworny, 2003). No

entanto, em condições naturais, a deficiência nutricional não é frequentemente verificável uma vez que existe na rizosfera uma multiplicidade de microrganismos que intervêm na disponibilidade de nutrientes. Estas questões colocam algumas restrições para o uso exclusivo dos testes *in vitro*, uma vez que na maioria das vezes os resultados obtidos nestas condições, nem sempre coincidem ou, às vezes, são opostos àqueles obtidos em condições não controladas (Boddy, 2000). Tem-se verificado que trabalhos de interação entre espécies fúngicas ectomicorrízicas e saprófitas, realizados sob condições não estéreis, são contraditórios relativamente à acção antagonista dos primeiros sobre os fungos saprófitas. Na interação entre os fungos ectomicorrízicos *Suillus variegatus*, *Paxillus involutus* e o fungo lenhícola *H. fasciculare*, efectuada em solo não estéril, os fungos ectomicorrízicos apresentam uma acção antagonista traduzida pela redução no crescimento do fungo lenhícola e pela captação de nutrientes (fósforo) deste para o fungo ectomicorrízico (Lindahl *et al.*, 1999). Contudo, esta acção antagonista não foi similar para as duas espécies ectomicorrízicas, apresentando a espécie *S. variegatus* uma acção antagonista superior ao *P. involutus*. Utilizando uma técnica de cultura e um substrato de interação similar, foram descritos resultados diferentes para o fungo ectomicorrízico *Suillus bovinus* quando em co-cultura com o fungo lenhícola *Phanerochaete velutina*, verificando-se apenas redução no crescimento do fungo micorrízico (Leake *et al.*, 2001). A diminuição do crescimento do fungo ectomicorrízico era ainda acompanhada pela redução da transferência de carbono da planta hospedeira para o fungo ectomicorrízico, e pelo aumento da acumulação de carbono no fungo lenhícola.

Neste trabalho, é descrita pela primeira vez a existência de uma acção inibitória no crescimento de *P. tinctorius* pelo fungo lenhícola *H. fasciculare*. A redução do crescimento de *P. tinctorius*, verificada anteriormente ao contacto físico entre as colónias fúngicas, sugere que o mecanismo antagonista adoptado pelo *H. fasciculare*, pelo menos durante as fases iniciais da interação, seja do tipo “antagonismo à distância” (Boddy, 2000). Trata-se de um mecanismo antagonista cujo efeito se encontra associado à produção de compostos voláteis e/ou difusíveis, tais como antibióticos (Inbar *et al.*, 1996; Calistru *et al.*, 1997; Boddy, 2000) ou metabolitos extracelulares, e inclusive enzimas extracelulares (Heilmann-Clausen & Boddy, 2005). Assim, é provável que na inibição do crescimento de *P. tinctorius* estejam envolvidos este tipo de compostos produzidos pelo fungo *H. fasciculare*. Esta hipótese parece ser

corroborada pelos resultados obtidos relativos à acidificação do meio de interação das co-culturas *P. tinctorius* - *H. fasciculare*, provavelmente devida à produção de compostos e/ou iões libertos para o meio de cultura pelos fungos em crescimento. De facto, o contacto dos halos de coloração das duas espécies fúngicas em co-cultura foi coincidente com o aparecimento de diferenças significativas na redução de crescimento do *P. tinctorius*, em relação ao respectivo controlo, sugerindo que a produção de compostos difusíveis sejam os responsáveis por tal reacção.

A reduzida inibição no crescimento, observada ao nível do raio interno (em cerca de 13%) das colónias fúngicas controlo estabelecidas entre *H. fasciculare* - *H. fasciculare* (Hf-Hf), face ao observado ao nível do raio externo, sugerem um comportamento muito agressivo e combativo desta espécie. Esta inibição no crescimento poderá resultar da competição por espaço ou inclusivamente por recursos (Boddy, 2000).

#### ***Alterações morfológicas das espécies interactuantes***

Durante a interação entre o fungo *P. tinctorius* e *H. fasciculare* (Pt-Hf), e ainda antes da ocorrência de contacto físico entre as colónias interactuantes, registaram-se alterações morfológicas macroscópicas ao nível do micélio de *P. tinctorius*. Logo após 6 dias de inoculação, o micélio de *P. tinctorius* adquiriu um aspecto mais denso e compacto, e com menor crescimento aéreo em relação às colónias de *P. tinctorius* controlo (Pt-Pt), que apresentavam predominância de um micélio com crescimento aéreo. Este aspecto tornou-se mais evidente na zona de interação com o fungo *H. fasciculare*, ao fim de 10 a 12 dias de cultura. Esta alteração morfológica em *P. tinctorius*, poderá constituir uma forma de tornar a colónia mais resistente à invasão do *H. fasciculare*, à semelhança do proposto para outras espécies fúngicas que desenvolvem mecanismos semelhantes em estudos de interação (Boddy, 2000). O aparecimento desta alteração morfológica no *P. tinctorius*, previamente ao estabelecimento de contacto físico com o *H. fasciculare*, sugere que esta possa ter tido origem da exsudação de compostos sintetizados durante a interação para o meio de cultura. Não está esclarecido o mecanismo responsável pela redução no crescimento micelial aéreo. No entanto, é sugerido que possa estar relacionado com alterações na

produção de metabolitos hidrofóbicos ou, alternativamente, com o aumento da actividade de lacase (Boddy, 2000).

As colónias de *H. fasciculare* apresentaram igualmente alterações em co-cultura com *P. tinctorius*. As margens das colónias em Pt-Hf apresentaram micélio menos denso em relação às colónias controlo Hf-Hf, onde o micélio se distribuía uniformemente. Esta redistribuição do micélio, correspondente ao aumento da densidade do micélio nas zonas distais à zona de interacção, pode constituir um mecanismo de resposta à presença *P. tinctorius*. À semelhança do referido para o *P. tinctorius*, é provável que estas alterações morfológicas resultem de alterações na actividade de enzimas (tais como a lacase) ou da produção de metabolitos hidrofóbicos (Boddy, 2000).

Na co-cultura estabelecida entre *P. tinctorius* - *H. fasciculare*, foi ainda possível observar a ocorrência de um outro mecanismo antagonista, frequentemente verificado na maioria das interacções fúngicas, que consiste na “interferência de hifas” (Boddy, 2000). Este mecanismo que parecer ter lugar na interacção *P. tinctorius*-*H. fasciculare*, foi apenas evidente nos estádios mais avançados da interacção, após o estabelecimento de contacto físico entre ambos os micélios interactuantes. Na zona de interacção entre os dois fungos interactuantes, as hifas de *P. tinctorius* apresentaram alterações morfológicas típicas deste mecanismo antagonista (Boddy, 2000; Woods *et al.*, 2005), tais como a granulação do protoplasma das hifas, associado a um pronunciado colapso e restrição das mesmas, ápice com formas atípicas ou a formação de estruturas semelhantes a vesículas e ainda destruição parcial das hifas. Os mecanismos de “interferência de hifas” são muito vulgares no seio dos fungos saprófitas-lenhícolas, tendo sido demonstrada a sua participação em inúmeros estudos de interacção com diversas espécies de fungos não-patogénicos ou patogénicos do solo e de sementes, realizados em cultura dupla (Nicolotti & Varese, 1996; Calistru *et al.*, 1997; Pratt *et al.*, 1999; Vainio *et al.*, 2001; Perelló *et al.*, 2003; Annesi *et al.*, 2005; Woods *et al.*, 2005; Cox & Scherm, 2006). No que concerne a estudos de interacção com fungos ectomicorrízicos, os resultados são contraditórios sendo possível observar alterações morfológicas em ambas as hifas fúngicas interactuantes (saprófita e ectomicorrízica) (Zadworny *et al.*, 2004) ou então somente ao nível das hifas do fungo saprófita (Werner *et al.*, 2002).

O mecanismo de antagonismo por “interferência de hifas” é caracterizado por uma inibição do crescimento e/ou indução da morte celular dos compartimentos celulares do fungo opositor, como consequência de uma série programada de eventos de destruição citoplasmática (Boddy, 2000; Woods *et al.*, 2005). Apesar do mecanismo de “interferências de hifas” não estar perfeitamente esclarecido, pensa-se que possam estar envolvidas a produção de enzimas líticas e de metabolitos difusíveis não-enzimáticos, nomeadamente de antibióticos, pelo fungo agressor. Estes ao alterarem a permeabilidade da membrana plasmática das hifas antagonizadas, originam a sua plasmólise e consequentemente a sua morte celular (Calistru *et al.*, 1997; Boddy, 2000). Esta interação antagonista pode ainda ser mediada pela libertação de toxinas não-enzimáticas (Boddy, 2000). Face ao exposto, é provável que as alterações morfológicas, observadas nas hifas de *P. tinctorius*, tenham sido originadas por este tipo de metabolitos extracelulares produzidos pelo fungo *H. fasciculare*.

Neste trabalho, o efeito antagonista evidenciado por *H. fasciculare* contra *P. tinctorius* parece assim ter resultado de vários mecanismos, tais como o “antagonismo à distância” e “interferência de hifas”. Nestes mecanismos de antagonismo poderão estar envolvidos compostos exsudados pelo fungo que ao entrarem em contacto com as hifas de *P. tinctorius* poderão influenciar o seu crescimento e funcionamento, e inclusivamente poderão induzir a sua morte celular. Na co-cultura estabelecida entre *H. fasciculare* e *P. tinctorius* foi igualmente possível observar, ao fim de 10-12 dias de interação, a produção de um pigmento acastanhado junto às margens das colónias de *P. tinctorius*, cuja intensidade aumentava com o decorrer da interação. Em estudos de interação fúngica, realizados em cultura dupla em meio de cultura, é frequente observar uma produção intra e/ou intercelular de pigmentos (Calistru *et al.*, 1997; Donnelly & Boddy, 2001; Murphy & Mitchell, 2001). Embora não esteja perfeitamente esclarecido qual o mecanismo indutor da produção deste tipo de pigmentos, pensa-se que possa constituir uma alteração no metabolismo como consequência de um stresse (nutritivo ou outro) imposto por um organismo mais agressivo (Calistru *et al.*, 1997; Murphy & Mitchell, 2001), ou então poderá ser o resultado da oxidação de compostos fenólicos pela fenoloxidase e peroxidase (Donnelly & Boddy, 2001). É provável que ambas as hipóteses estejam envolvidas na produção de pigmentos acastanhados pelo fungo *P. tinctorius*, quando em cultura com um fungo mais agressivo, o *H. fasciculare*.

### ***Produção de cristais de cálcio como resposta da interação***

Na zona de interação entre *P. tinctorius* e *H. fasciculare* foram registadas, ao fim de 25 dias de co-cultura, a presença de um grande número de estruturas cristalinas fortemente aderentes às hifas de *P. tinctorius*. A análise destes cristais por microanálise por Raio-X, associada à microscopia electrónica de varrimento, revelou uma constituição rica em cálcio. Apesar destes cristais de cálcio apresentarem dimensão e forma variável, a maioria exibia um aspecto laminado, com morfologias muito similares às apresentadas pelo oxalato de cálcio produzido pelos fungos (Tait *et al.*, 1999; Kolo & Claeys, 2005). Assim, e apesar de não se ter estudado a sua composição, os resultados obtidos sugerem que estas estruturas cristalinas possam ser cristais de oxalato de cálcio. As imagens de microscopia óptica e electrónica de varrimento não permitiram elucidar qual a espécie fúngica responsável pela produção destas estruturas. Contudo, a forte adesão de cristais à superfície das hifas do fungo *P. tinctorius*, sugerem que esta espécie possa ser a responsável pela sua produção.

A deposição de cristais de oxalato de cálcio sobre a superfície das hifas fúngicas é um processo comum, tendo sido já referida a sua produção em inúmeras espécies de basidiomicetos, quando em crescimento em meio de cultura. De entre estas destacam-se as espécies saprófitas-lenhícolas *Coriolus versicolor*, *Heterobasidion annosum*, *Pleurotus florida*, *Phanerochaete chryosporium*, *Agaricus bisporus*, *Amyloporia xantha*, *Coniophora marmorata*, *C. puteana*, *Poria vaporaria* (Dutton *et al.*, 1993) e a espécie ectomicorrízica *Suillus bovinus* (Sun *et al.*, 1999). A deposição de cristais de oxalato de cálcio tem sido igualmente observada em ectomicorrizas formadas em condições naturais (solo) (Lapeyrie *et al.*, 1987; Arocena *et al.*, 2001; Massicotte *et al.*, 2005) ou em condições de *in vitro* mediante inoculações com as espécies fúngicas ectomicorrízicas *Paxillus involutus* (Lapeyrie *et al.*, 1987), *Piloderma* spp. (Arocena *et al.*, 2001) e *Rhizopogon roseolus* (Casarin *et al.*, 2003).

A produção de oxalato de cálcio pelos fungos resulta da reacção entre o ácido oxálico, produzido pelos fungos, e o cálcio presente no meio de crescimento (Kolo & Claeys, 2005). De facto, a produção de oxalato de cálcio é considerada como um processo de destoxificação do cálcio presente no meio de crescimento do fungo, uma vez que a existência de quantidades elevadas deste elemento pode exercer toxicidade nas células fúngicas (Lapeyrie *et al.*, 1987; Sun *et al.*, 1999; Tait *et al.*, 1999; Kolo & Claeys, 2005). Desta forma, é provável que os cristais observados sobre a superfície das

hifas de *P. tinctorius* tenham tido origem na reacção entre o ácido oxálico e o cálcio presente no meio de cultura. Dado que a observação de cristais somente ocorreu na interacção entre *P. tinctorius* - *H. fasciculare*, e não nas interacções controlo Pt-Pt e Hf-Hf, e sabendo que o meio de cultura foi idêntico em todos os ensaios, a produção de cristais de oxalato de cálcio parece ser uma consequência do processo de interacção. A acidificação do meio de cultura, observada na co-cultura *P. tinctorius*-*H. fasciculare*, sugere que de entre outros compostos produzidos com propriedades ácidas, possa estar incluído o ácido oxálico. No entanto, o aparecimento do halo de acidificação, em redor de ambas as colónias fúngicas interactuantes, foi igualmente visível nas interacções Pt-Pt e Hf-Hf que não produziram cristais de oxalato de cálcio, o que sugere que a acidificação do meio não se deve exclusivamente à produção de ácido oxálico. De qualquer modo, a acumulação de ácido oxálico no meio de cultura observável pela rápida redução dos valores de pH, tinha sido já referido em fungos decompositores (Shimada *et al.*, 1997). Nestes fungos, o ácido oxálico actua principalmente no processo de decomposição vegetal (madeira, entre outros) da celulose, hemicelulose e lenhina, ao intervir em diversos mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (Shimada *et al.*, 1997). A produção de ácido oxálico pelos fungos ectomicorrízicos encontra-se normalmente associada ao aumento da disponibilidade de nutrientes para a planta hospedeira, nomeadamente de fósforo e de ferro (Lapeyrie *et al.*, 1987; Tait *et al.*, 1999; Massicotte *et al.*, 2005). A produção de ácido oxálico contribui igualmente para a patogenicidade de diversas espécies fúngicas fitopatogénicas, pela acidificação dos tecidos do hospedeiro e pela sequestração de cálcio das paredes celulares do hospedeiro, facilitando assim a degradação da parede celular (Dutton & Evans, 1996). A deposição de oxalato de cálcio observada em alguns fungos pode ainda constituir uma barreira física, conferindo dureza às suas hifas e, desta forma, contribuindo para a sua defesa contra o ataque de fungos patogénicos (Arocena *et al.*, 2001). O mecanismo envolvido na produção destes cristais e o seu papel na interacção entre *P. tinctorius* e *H. fasciculare* ainda necessita de ser esclarecido.



## **CAPÍTULO 5**

**Estudo das interacções:**

*Castanea sativa – Pisolithus tinctorius*

*Castanea sativa – Hypholoma fasciculare*



## 5.1 INTRODUÇÃO

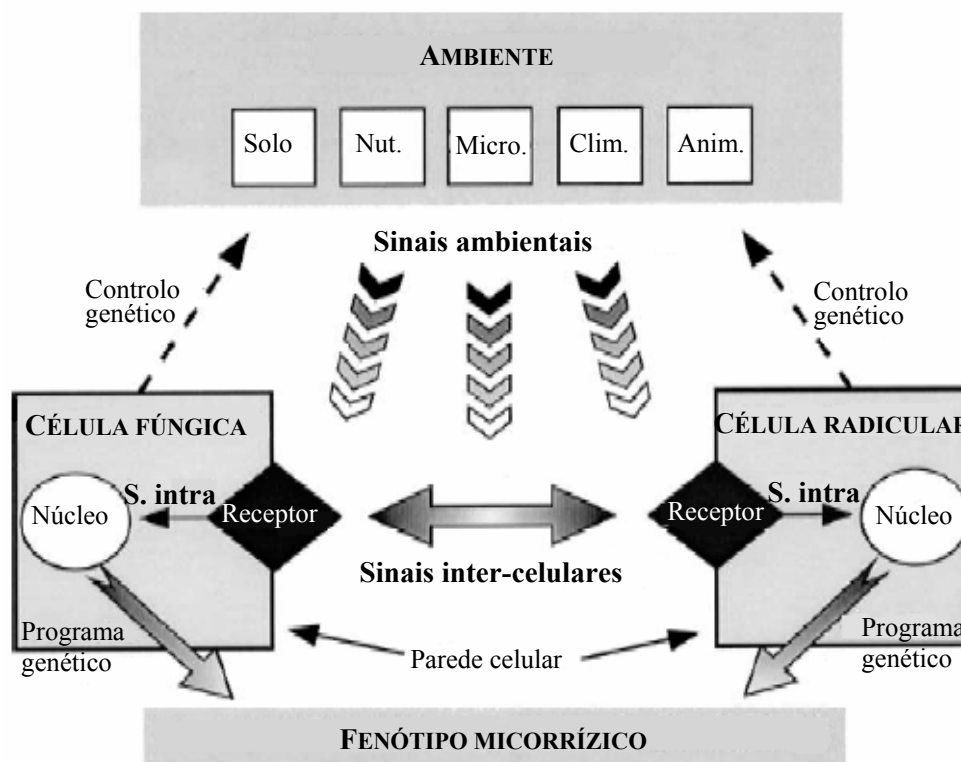
### 5.1.1 Simbiose ectomicorrízica

As plantas desenvolveram uma multiplicidade de estratégias de forma a sobreviverem à grande diversidade de estímulos bióticos e abióticos. Uma das estratégias adoptadas com sucesso pelas plantas consistiu no desenvolvimento de associações mutualistas com fungos superiores de vida livre, fungos das classes zigomicetos, ascomicetos e basidiomicetos, formando as ectomicorrizas (Smith & Read, 1997). Nesta relação mutualista, a planta hospedeira recebe nutrientes minerais por intermédio do fungo e, em contrapartida, o fungo obtém compostos carbonados de origem fotossintética.

A iniciação, o desenvolvimento e a manutenção de uma simbiose ectomicorrízica funcional envolve uma série de acontecimentos que ocorrem entre solo, fungo e raiz (Tagu *et al.*, 2002). Durante o estabelecimento ectomicorrízico, a planta possui a capacidade de reconhecer e de se associar ao fungo. Por sua vez, o fungo consegue aderir e penetrar na raiz, contornando os mecanismos de defesa da planta hospedeira. A biodiversidade existente na rizosfera, designadamente de bactérias, fungos, nemátodes e de invertebrados, é de extrema importância para o desenvolvimento da micorrização (Tagu *et al.*, 2002).

No processo ectomicorrízico é essencial que ocorra a troca de sinais entre os simbiossiontes, para que seja reconhecida a sua compatibilidade e para que ocorra a preparação de ambos os parceiros para as modificações fisiológicas e morfológicas essenciais na formação dos órgãos ectomicorrízicos (Figura 5.1) (Martin *et al.*, 2001b; Voiblet *et al.*, 2001; Podila, 2002). É proposto que a iniciação e a manutenção da comunicação estabelecida entre os simbiossiontes se deva ao facto de ambos terem desenvolvido moléculas sensoras (receptores ou moléculas sinalizadoras), responsáveis pela rápida adaptação às modificações ambientais na imediação das células radiculares (Tagu *et al.*, 2002). Adicionalmente, estas moléculas sensoras poderão transferir intracelularmente os sinais ao núcleo, através de vias sinalizadoras, induzindo ou reprimindo os genes específicos responsáveis pelo fenótipo ectomicorrízico. Assim sendo, a formação de ectomicorrizas afigura-se como um processo de interacção, caracterizado por uma sequência de eventos altamente regulados e coordenados (Martin *et al.*, 2001b; Voiblet *et al.*, 2001).

Até à data, a natureza molecular dos sinais emitidos (moléculas sinalizadoras), bem como os mecanismos de reconhecimento e interação dos parceiros simbióticos, não se encontra perfeitamente esclarecida, tratando-se de uma área de estudo muito atractiva e promissora.

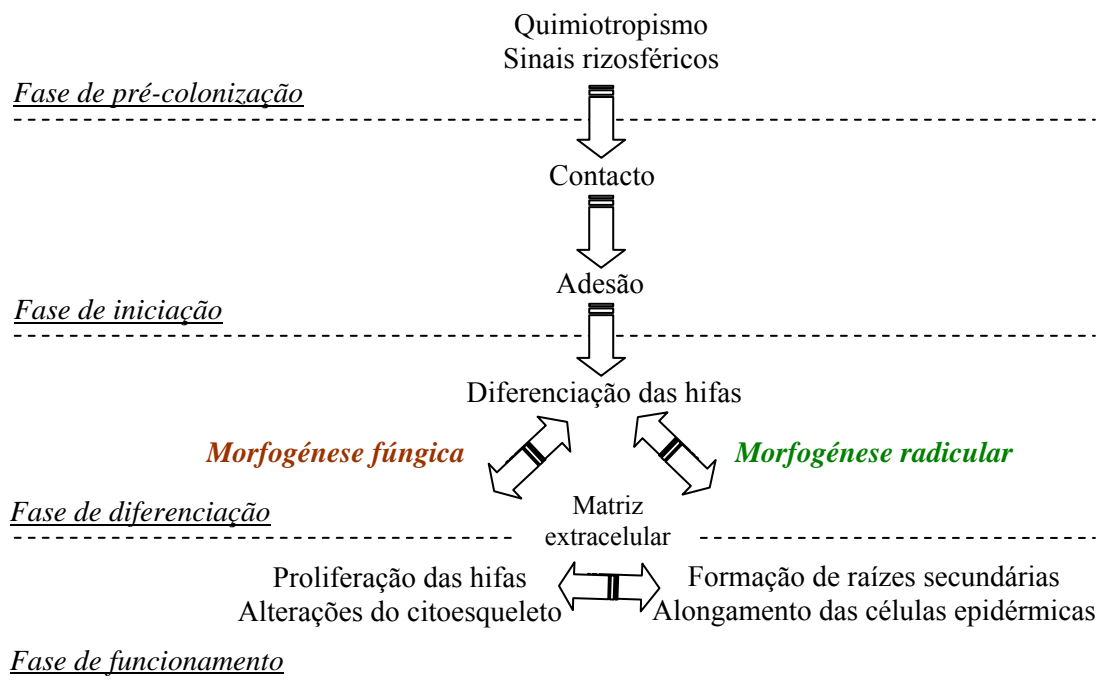


**Figura 5.1** Comunicações inter- e intra-celulares estabelecidas entre as hifas do fungo e as células radiculares no desenvolvimento ectomicorrízico. Alterações ambientais podem desenvolver sinais que, após percepção por ambos os parceiros, são transduzidos para o núcleo provocando modificações na expressão génica e conseqüentemente no fenótipo. S. intra – sinais intra-celulares, Nut. – nutrientes, Micro. – microrganismos, Clim. – factores climáticos, Anim. – animais (incluindo o Homem) (adaptado de Tagu *et al.*, 2002).

### 5.1.1.1 Desenvolvimento ectomicorrízico

A formação de ectomicorrizas engloba normalmente quatro estádios: a pré-colonização, a iniciação, a diferenciação e o funcionamento (Figura 5.2) (Martin *et al.*, 2001b). Durante a pré-colonização, ocorre a troca de sinais entre as raízes da planta e o fungo simbionte, permitindo o reconhecimento da compatibilidade da simbiose. A raiz e o micélio fúngico iniciam então o seu crescimento até ao estabelecimento de contacto físico (iniciação). Depois do contacto, as hifas crescem gradualmente por entre as células da epiderme e do córtex radicular, formando os órgãos ectomicorrízicos manto e

rede de Hartig (diferenciação) e inicia-se a transferência bidireccional de nutrientes (funcionamento). Durante as diferentes etapas envolvidas na morfogénese ectomicorrízica, especialmente na germinação dos esporos fúngicos, na quimioatração entre fungo-raiz, na adesão e penetração do fungo na raiz, e no desenvolvimento de estruturas micorrízicas (manto e rede de Hartig), a permuta de sinais entre os simbiontes é fundamental (Tagu *et al.*, 2002).



**Figura 5.2** Fases envolvidas na morfogénese ectomicorrízica (adaptado de Martin & Tagu, 1995).

O tempo requerido por cada etapa do desenvolvimento ectomicorrízico, desde a pré-colonização até à formação do manto e da rede de Hartig, é variável e dependente sobretudo da compatibilidade genética dos parceiros, dos factores abióticos e da técnica de estabelecimento da micorrização (condições axénicas ou não axénicas) (Smith & Read, 1997). Para que seja possível o estudo de interações hóspede-hospedeiro nas associações ectomicorrízicas é necessário que se proceda ao estabelecimento de ectomicorrizas em condições axénicas, uma vez que em condições naturais existe uma multiplicidade de factores bióticos e abióticos, não controláveis, que podem interferir. No sistema *in vitro*, geralmente a pré-colonização e adesão das hifas à superfície

radicular da planta hospedeira ocorrem nas primeiras 24 horas; e a formação do manto e da rede de Hartig entre as 24 horas e os 7 dias de micorrização (Tabela 5.1) (Martin & Tagu, 1995; Le Quéré *et al.*, 2005).

**Tabela 5.1** Períodos de tempo em que ocorre cada um dos estádios do desenvolvimento ectomicorrízico de *Eucalyptus*, após inoculação com *Pisolithus tinctorius*, em condições *in vitro*. As principais características anatómicas que ocorrem em cada um dos estádios são igualmente descritas (adaptado de Martin & Tagu, 1995).

Tempo	Estádio de desenvolvimento	Características anatómicas
0-12h	Pré-colonização	Contacto hifa-raiz
12-24h	Início da simbiose	Adesão das hifas à superfície radicular
24-48h	Colonização do fungo	Formação das primeiras camadas do manto Penetração das hifas nos espaços intercelulares das células epidérmicas
48-96h	Diferenciação da simbiose	Rápida formação do manto Proliferação da rede de Hartig
96h-7dias	Funcionamento da simbiose	Manto denso com forte aderência à superfície radicular Final da formação da rede de Hartig

### 5.1.1.2 Sinais rizosféricos emitidos durante a pré-colonização

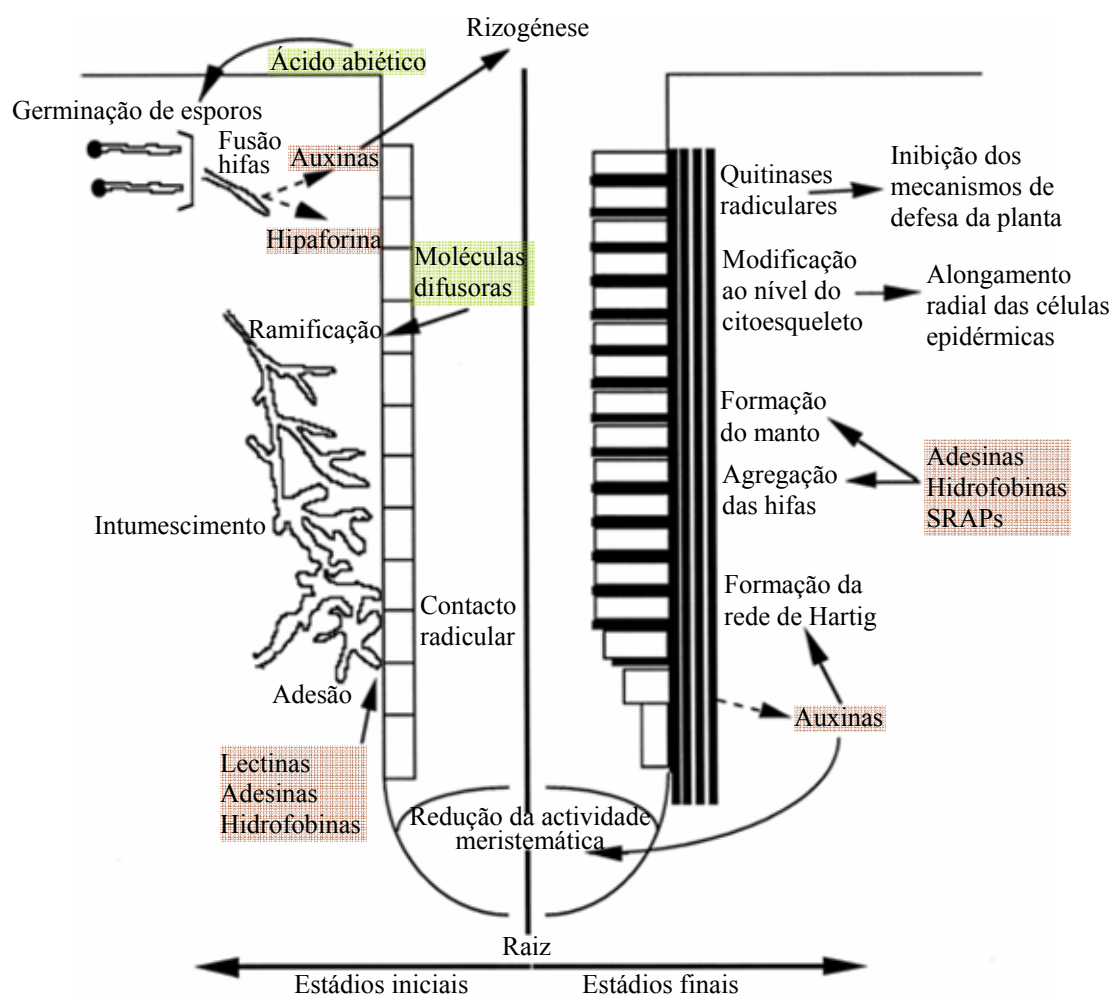
A troca de sinais entre os parceiros simbióticos surge muito tempo antes da ocorrência de contacto físico, sugerindo o envolvimento de eliciadores difusíveis nas primeiras fases da interacção ectomicorrízica. No trabalho desenvolvido por Menotta *et al.* (2004) verificou-se que 58 genes do fungo ectomicorrízico *Tuber borchii* apresentavam expressão diferencial antes da ocorrência de qualquer contacto físico com o seu hospedeiro simbiótico *Tilia americana*. Foi igualmente observado que genes fúngicos, potencialmente envolvidos em vias de sinalização, como aqueles que codificam proteínas *ras* e *PF6.2* (Kim *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2001b; Sundaram *et al.*, 2001), eram induzidos antes de haver contacto físico com as raízes do hospedeiro.

No estágio de pré-colonização as hifas colonizadoras detectam a presença da raiz da planta hospedeira (Tagu *et al.*, 2002). As hifas colonizadoras podem ser originárias de um esporo em germinação ou de uma micorriza já existente. No caso do fungo colonizador provir da germinação de esporos, a percepção da raiz pelo fungo pode resultar de modificações que ocorrem na composição nutricional na rizosfera. A

depleção em azoto e o enriquecimento em carbono na zona envolvente da raiz, como resultado da absorção de azoto e da secreção de açúcares por parte da planta hospedeira, podem constituir sinais tróficos para a germinação dos esporos fúngicos (Tagu *et al.*, 2002). Contudo, estes sinais tróficos muito provavelmente não serão específicos, podendo igualmente intervir na percepção da planta hospedeira por parte de fungos saprófitas e patogénicos (Tagu *et al.*, 2002).

Os exsudados radiculares e fúngicos parecem constituir sinais mais específicos para que ocorra a percepção e o reconhecimento de uma associação compatível (Figura 5.3). Durante a pré-colonização, a secreção de determinadas moléculas sinalizadoras por parte da planta potenciam a germinação de esporos e o crescimento do micélio (Fries *et al.*, 1987; Horan & Chilvers, 1990; Barker *et al.*, 1998; Barker & Tagu, 2000; Lagrange *et al.*, 2001a). Fries *et al.* (1987) constataram que exsudados radiculares de *Pinus sylvestris* induziam a germinação de esporos de espécies fúngicas pertencentes ao género *Suillus* (*S. granulatus*, *S. grevillei*, *S. luteus*, *S. variegatus*). Este composto indutor da germinação foi identificado como sendo o ácido abiético que, segundo os mesmos autores, poderá desempenhar um papel importante no processo micorrízico por conferir vantagem selectiva ao fungo *Suillus* sp. relativamente aos restantes fungos presentes na rizosfera. Em exsudados radiculares de *Eucalyptus globulus* ssp. *bicostata* foi igualmente detectada a presença de flavonóides, nomeadamente de rutina, que estimulavam o crescimento de várias estirpes de *Pisolithus tinctorius* (Lagrange *et al.*, 2001a). Nos estádios iniciais da micorrização *in vitro* de raízes de *Larix decidua* pelo fungo ectomicorrízico *Suillus tridentinus* verificou-se igualmente um aumento da concentração de fenilpropanóides, principalmente de flavonóides, ácidos benzóicos e ácidos cinâmicos, sugerindo que estes compostos possam constituir sinais importantes na simbiose ectomicorrízica (Weiss *et al.*, 1997). Contudo, a identificação de moléculas indutoras de crescimento fúngico nem sempre foi conseguida, mesmo após demonstração da sua presença. No trabalho desenvolvido por Horan & Chilvers (1990) foi provado que a presença de moléculas difusoras provenientes da raiz hospedeira actuavam como quimioatractivos dos fungos *P. tinctorius* e *Paxillus involutus* sem, no entanto, ter-se conseguido a sua identificação.

A produção de citocininas, nomeadamente de zeatina, por parte da raiz hospedeira parece também exercer influência no padrão de crescimento e de ramificação das hifas do fungo micorrízico (Barker & Tagu, 2000; Martin *et al.*, 2001b).



**Figura 5.3** Representação esquemática da formação de ectomicorrizas. As modificações morfológicas que ocorrem durante os estádios iniciais (esquerda) e finais (direita) da formação ectomicorrízica estão esquematizadas. As moléculas potencialmente envolvidas neste processo produzidas pela planta estão sombreadas a verde, e aquelas produzidas pelo fungo estão sombreadas a rosa (adaptado de Barker *et al.*, 1998).

A síntese de moléculas sinalizadoras pelo fungo ectomicorrízico possui igualmente um papel essencial nos estádios iniciais da morfogénese ectomicorrízica (Barker & Tagu, 2000; Martin *et al.*, 2001b). Vários autores têm atribuído às auxinas produzidas pelo fungo um papel importante como molécula sinalizadora nos estádios iniciais do desenvolvimento ectomicorrízico (Nehls *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 1999; Rincón *et al.*, 2001). Adicionalmente, a produção de eliciadores ou de moléculas sinalizadoras por parte da planta hospedeira são controlados pelos níveis de ácido indolacético (IAA) produzido pelo fungo simbionte (Mensen *et al.*, 1998; Rincón *et al.*,

2001). Assim, as alterações no balanço de auxinas parecem constituir um pré-requisito para a organogénese das micorrizas (Barker & Tagu, 2000).

A secreção de um outro composto indólico, a hipaforina, por parte do fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* parece influenciar igualmente o estabelecimento simbiótico (Béguiristain *et al.*, 1995; Béguiristain & Lapeyrie, 1997; Ditengou *et al.*, 2000). Este alcalóide fúngico, presente em quantidades não desprezáveis no micélio ou nos extractos fúngicos de *P. tinctorius* quando em cultura pura (Béguiristain *et al.*, 1995), é particularmente produzido durante a formação ectomicorrízica. Ao fim de 24 horas após a inoculação de raízes de plântulas de *Eucalyptus globulus* com o fungo *P. tinctorius*, é observado um aumento de hipaforina (de 3 a 5 vezes) no micélio colonizador relativamente ao micélio em crescimento em cultura pura (Béguiristain & Lapeyrie, 1997). A planta hospedeira parece estimular a produção de hipaforina no fungo, a qual será absorvida e translocada para vários órgãos, incluindo a parte aérea, onde poderá regular a actividade de auxinas endógenas (Nehls *et al.*, 1998; Jambois *et al.*, 2005). A hipaforina revelou ainda possuir um efeito morfogénico nas raízes de plântulas de *Eucalyptus globulus*, ao promover uma acentuada redução do alongamento dos pêlos radiculares (Béguiristain & Lapeyrie, 1997; Ditengou *et al.*, 2000; Ditengou & Lapeyrie, 2000; Ditengou *et al.*, 2003). Apesar do papel destes compostos no estabelecimento da associação simbiótica não estar perfeitamente esclarecido, os resultados obtidos até ao momento sugerem que a hipaforina secretada pelo fungo regula os níveis endógenos de IAA da planta, permitindo a redução do crescimento dos pêlos radiculares, que constitui uma característica marcante das raízes micorrizadas (Barker & Tagu, 2000; Ditengou *et al.*, 2000; Jambois *et al.*, 2005).

### 5.1.1.3 Proteínas envolvidas na adesão e formação da interface simbiótica

Para que se verifique a formação de estruturas ectomicorrízicas (manto e rede de Hartig) é necessário que ocorra o contacto físico entre o fungo ectomicorrízico e a superfície radicular (o designado, contacto célula-célula). Logo após contacto com a planta hospedeira, verificam-se alterações morfológicas ao nível do crescimento do fungo ectomicorrízico, que se caracteriza por um aumento da ramificação e do intumescimento das hifas (Figura 5.3). Estas alterações morfológicas são ainda acompanhadas por um aumento da divisão nuclear (Martin & Tagu, 1995). Não se

conhece ao certo qual o sinal ou o mecanismo responsável por estas alterações morfológicas. No entanto, e considerando que no caso dos fungos patogénicos a virulência parece ser induzida pela limitação de azoto, a deficiência de nutrientes na zona envolvente da raiz poderá constituir um dos sinais desta modificação morfológica (Barker *et al.*, 1998). Exsudados radiculares e a topografia da superfície radicular podem igualmente potenciar a ramificação e o intumescimento das hifas (Tagu *et al.*, 2002). Estas modificações morfogénicas parecem constituir um indicador da compatibilidade da interacção entre os parceiros simbióticos (Peterson & Bonfante, 1994).

No processo de adesão do fungo à raiz da planta hospedeira estão envolvidas várias classes de proteínas com propriedades específicas ao nível da adesão celular, secretadas pelo fungo ectomicorrízico (Figura 5.3). Estudos de análise ultraestrutural da zona de interface fungo ectomicorrízico-raiz, nos estádios iniciais de colonização, revelaram a presença de um material fibrilar rico em glicoproteínas (adesinas), proveniente da parede fúngica em direcção à raiz (Lei *et al.*, 1990a; Lei *et al.*, 1990b; Martin *et al.*, 1999; Rincón *et al.*, 2001). As adesinas são complexos proteicos que reconhecem e se ligam a receptores na superfície das células da planta, participando na adesão das hifas à superfície radicular no desenvolvimento ectomicorrízico (Martin *et al.*, 1999; Gross *et al.*, 2004). Estas adesinas desempenham igualmente um papel importante na agregação do micélio, aquando da formação do manto, nos estádios finais da micorrização (Martin & Tagu, 1995).

As lectinas parecem ter uma função semelhante às adesinas, no processo de adesão fungo-raiz nos estádios iniciais da formação ectomicorrízica, podendo também intervir nos estádios finais da micorrização. Em raízes de *Picea abies* inoculadas com *Lactarius deterrimus* foi detectado um aumento de secreção de lectina pelo fungo ectomicorrízico, a qual se acumulava preferencialmente junto aos pêlos radiculares e aos ápices das raízes secundárias da planta hospedeira (Giollant *et al.*, 1993). Contrariamente, a expressão diferencial de genes, durante o desenvolvimento ectomicorrízico estabelecido entre *Betula pendula* e *Paxillus involutus*, evidenciou uma repressão dos genes de lectina fúngica durante os estádios iniciais da micorrização, os quais eram induzidos aos 14 dias após inoculação (Le Quéré *et al.*, 2005).

A pesquisa de genes diferencialmente expressos durante as interações ectomicorrízicas tem contribuído muito para a identificação de outras classes de

proteínas com funções de adesão. Na interação ectomicorrízica *Pisolithus* – *Eucalyptus* foi possível detectar a expressão diferencial de genes fúngicos que codificam proteínas hidrofóbicas - as hidrofobinas (Tagu *et al.*, 1996; Duplessis *et al.*, 2001; Voiblet *et al.*, 2001; Peter *et al.*, 2003; Duplessis *et al.*, 2005). Estas proteínas são normalmente secretadas pelo fungo para o meio extracelular ou são depositadas sobre a superfície da parede celular fúngica. As hidrofobinas apresentam uma distribuição conservada de oito resíduos de cisteína na sua sequência aminoacídica, os quais estabelecem ligações dissulfureto entre si (Linder *et al.*, 2005). Cada molécula possui duas partes nitidamente diferenciadas, uma porção hidrofílica (que se encontra ligada à superfície celular fúngica) e outra porção hidrófoba (projectada para o meio exterior). Dado tratarem-se de moléculas anfipáticas, conferem hidrofobicidade à superfície fúngica que se encontra em contacto com o ar e também medeiam a ligação entre as hifas e as superfícies hidrófobas. Sendo assim, as hidrofobinas parecem promover a adesão das hifas à superfície da célula hospedeira e por outro a agregação das hifas (Kershaw & Talbot, 1998; Wösten, 2001). A presença de vários tipos de hidrofobinas numa mesma espécie fúngica, como acontece no caso do *Pisolithus tinctorius*, onde já foram identificados sete genes (designados por *HydPt-1* a *HydPt-6* e *HydPt-8*; Tagu *et al.*, 1996; Duplessis *et al.*, 2001; Voiblet *et al.*, 2001; Duplessis *et al.*, 2005) pode ser relevante na complementação de funções (Linder *et al.*, 2005). As diferentes hidrofobinas possuem pequenas diferenças estruturais, associadas provavelmente a funcionalidades diferentes, para além de serem diferencialmente expressas durante o desenvolvimento do fungo ou como resultado das condições ambientais (Linder *et al.*, 2005).

A presença de hidrofobinas foi já descrita em pelo menos 20 espécies de fungos pertencentes às classes ascomycetes, basidiomycetes e zigomycetes (Wessels, 1996). Estas proteínas encontram-se ainda descritas como estando envolvidas noutros processos de desenvolvimento dos fungos, como seja, no crescimento aéreo das hifas, na agregação das hifas aquando da formação dos corpos de frutificação (carpóforos), na esporulação e dispersão de esporos em fungos filamentosos, e ainda na infecção de alguns fungos patogénicos de plantas e insectos (Wessels, 1996; Kershaw & Talbot, 1998; Wösten, 2001; Linder *et al.*, 2005). Neste último caso, as hidrofobinas desempenham um papel essencial, uma vez que a penetração e a posterior infecção dependem da adesão do patogéneo à superfície hidrófoba do hospedeiro (Wessels, 1996; Wösten, 2001). Para além do seu papel na adesão entre raiz-fungo no processo de

colonização das raízes pelo fungo ectomicorrízico, as hidrofobinas têm sido recentemente implicadas no processo de reconhecimento da planta hospedeira e na especificidade do fungo em relação ao hospedeiro (Mankel *et al.*, 2002).

No estabelecimento de ectomicorrizas com *Pisolithus tinctorius*, a análise da expressão dos genes de hidrofobinas sugerem que estas proteínas provavelmente participam apenas na adesão das hifas à superfície radicular e não na formação do manto fúngico ou da rede de Hartig (Martin *et al.*, 1999), apesar de terem sido detectadas hidrofobinas nas hifas que constituíam o manto e a rede de Hartig da associação *Pisolithus-Eucalyptus* (Tagu *et al.*, 2001). De qualquer modo, nesta interação ectomicorrízica, o nível de RNAm codificante de hidrofobinas é induzido nos estádios iniciais do desenvolvimento ectomicorrízico e suprimido ao fim de 4 dias de micorrização (Tagu *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 1999). Resultados semelhantes foram obtidos por Sebastiana (2006) ao verificar a sobre-expressão de *HydPt-2* e *HydPt-3*, 12 horas após contacto entre raízes de *Castanea sativa* e o fungo *P. tinctorius*. Curiosamente, outros estudos de expressão diferencial de genes, durante o estabelecimento de outras interações ectomicorrízicas, descrevem resultados contraditórios quanto à expressão de genes que codificam hidrofobinas (Mankel *et al.*, 2002; Johansson *et al.*, 2004; Le Quéré *et al.*, 2005). Existem indícios de que esta expressão possa variar de espécie para espécie fúngica ou planta hospedeira, ou mesmo ser influenciada pela presença de certos nutrientes no substrato, sugerindo uma regulação complexa dos genes de hidrofobinas durante o processo de micorrização (Martin *et al.*, 1999; Santos, 2006).

Uma outra classe de proteínas de adesão foi identificada em *P. tinctorius*, após a detecção da sua sobre-expressão ao quarto dia de colonização de raízes de *Eucalyptus globulus* (Laurent *et al.*, 1999). Estas proteínas - *symbiosis-regulated acidic polypeptides* (SRAPs) – apresentam pelo menos seis isoformas com uma massa molecular que varia entre 31-32 kDa. As SRAPs que possuíam uma massa molecular correspondente a 31 e 32 kDa foram designadas, respectivamente, por SRAP<sub>31</sub> e SRAP<sub>32</sub>. Caracterizam-se por apresentarem a sequência aminoacídica Arginina-Glicina-Ácido aspártico (RGD) (Martin *et al.*, 1999), vulgarmente associada à adesão em células animais (Critchley *et al.*, 1999) e vegetais (Mellersh & Heath, 2001; Meinhardt *et al.*, 2002). Em conformidade, estudos efectuados para a localização celular das SRAP<sub>32</sub> durante o desenvolvimento ectomicorrízico, detectaram uma acumulação

preferencial sobre a superfície das hifas, na interface fungo-raiz e na superfície das hifas que formam a rede de Hartig (Laurent *et al.*, 1999). A sugestão de que as proteínas SRAP estão associadas à agregação das hifas aquando da formação do manto fúngico e também no desenvolvimento da rede de Hartig é ainda corroborada pela análise de genes diferencialmente expressos durante o estabelecimento de ectomicorrizas. Ao fim de quatro dias de micorrização de *E. globulus* com *P. tinctorius* é detectado um aumento de transcritos codificantes de SRAP<sub>32</sub> (4,1 vezes) e de um novo gene (4,7 vezes) que codifica uma proteína de pequena massa molecular (17 kDa), denominada SRAP<sub>17</sub> (Voiblet *et al.*, 2001). Contudo, a participação de SRAPs no desenvolvimento ectomicorrízico parece decrescer nos estádios finais da micorrização, sendo detectada uma repressão dos genes que codificam SRAP<sub>32</sub> e de SRAP<sub>17</sub> a partir dos 7-12 dias de desenvolvimento da simbiose *E. globulus*-*Pisolithus microcarpus* (Duplessis *et al.*, 2005).

#### 5.1.1.4 Morfogénese da ectomicorriza

O desenvolvimento e manutenção de uma simbiose ectomicorrízica funcional envolve modificações morfológicas significativas em ambos os parceiros. As maiores modificações morfogénicas que ocorrem no fungo simbiote são (i) a agregação das hifas para formação do manto que envolve a superfície radicular (ii) e a penetração e crescimento das hifas por entre as células epidérmicas e corticais da raiz, formando a rede de Hartig (Figura 5.3) (Smith & Read, 1997).

O desenvolvimento do manto fúngico requer uma série de eventos altamente programados e coordenados. Após contacto e adesão às células epidérmicas radiculares, as hifas multiplicam-se gerando várias camadas, as quais se irão diferenciar num manto plenamente desenvolvido (Martin *et al.*, 2001b). A morfologia do manto é dependente dos genomas da planta hospedeira e do fungo simbiote que estabelecem a interação, recorrendo-se por isso frequentemente ao estudo da estrutura do manto para identificação de fungos micorrízicos presentes no solo (Peterson & Bonfante, 1994). Existem indicações de que a formação do manto é influenciada pela planta hospedeira, a qual estimula o crescimento das hifas e promove o desenvolvimento de um manto perfeitamente compacto (Martin *et al.*, 2001b). Diversos factores abióticos, nomeadamente a disponibilidade de nutrientes e de oxigénio, podem igualmente

influenciar o desenvolvimento do manto (Peterson & Bonfante, 1994; Martin *et al.*, 1999).

A rede de Hartig é o conjunto das hifas fúngicas que penetram intercelularmente na raiz. A penetração do fungo no espaço apoplástico da raiz é feita através de um processo de natureza mecânica, mas também pode envolver a produção de enzimas líticas que digerem a parede celular das células do hospedeiro (Cairney & Burke, 1994). Devido à sua incapacidade em degradar a lenhina e suberina presente na parede das células da endoderme, o crescimento do fungo é restringido apenas às células corticais da raiz (Barker *et al.*, 1998). A rede de Hartig pode desenvolver-se somente ao nível das células da epiderme (na maioria das angiospérmicas) ou penetrar por entre as células corticais podendo atingir a endoderme, como é típico nas gimnospérmicas (Peterson & Bonfante, 1994; Smith & Read, 1997). O facto do mesmo fungo colonizar somente as células epidérmicas ou adicionalmente as células corticais, dependendo da planta hospedeira, sugere que é a planta hospedeira quem influencia e controla o crescimento fúngico. Apesar de existirem indicações de uma relação entre a formação da rede de Hartig e a produção de auxinas, nomeadamente de ácido indol-acético, por parte do fungo ectomicorrízico (Figura 5.3) (Gay *et al.*, 1994; Karabaghli-Degron *et al.*, 1998; Mensen *et al.*, 1998; Rincón *et al.*, 2001), os mecanismos moleculares subjacentes a esta interacção são ainda desconhecidos (Smith & Read, 1997).

Na planta hospedeira ocorrem simultaneamente modificações estruturais sobretudo ao nível do meristema radicular e das células epidérmicas (Figura 5.3). A progressão do fungo ectomicorrízico pelos espaços intercelulares das células epidérmicas radiculares, na maioria das angiospérmicas, provoca alterações na sua morfologia. O contacto físico com o fungo, promove um alongamento radial (alongamento transversal oblíquo) das células da raiz. Modificações nos níveis e na organização de filamentos de actina (microfilamentos) e de tubulina (microtúbulos) em células radiculares e/ou fúngicas, durante o processo de micorrização, sugerem um papel destas proteínas na morfogénese ectomicorrízica (Timonen *et al.*, 1993; Carnero Diaz *et al.*, 1996; Timonen *et al.*, 1996; Johansson *et al.*, 2004; Le Quéré *et al.*, 2005). Em estudos de expressão diferencial de genes fúngicos durante o desenvolvimento de vários sistemas ectomicorrízicos, proteínas associadas à actina e a microtúbulos foram igualmente detectadas (Voiblet *et al.*, 2001; Timonen & Peterson, 2002; Menotta *et al.*, 2004; Le Quéré *et al.*, 2005). Contudo, ainda não está esclarecido se estas alterações da

expressão genética ao nível do citoesqueleto são uma causa ou consequência da morfogênese radicular micorrízica (Barker *et al.*, 1998).

Após colonização do sistema radicular pelo fungo ectomicorrízico ocorre a redução da actividade meristemática radicular, ao contrário do verificado nos estádios iniciais da micorrização, e o aparecimento de estruturas dicotómicas (Peterson & Bonfante, 1994). Estas alterações morfológicas são atribuídas, em grande parte, à acção das auxinas produzidas pelo fungo. Segundo Barker & Tagu (2000), a inibição da divisão das células meristemáticas deriva da percepção das elevadas concentrações de auxinas fúngicas pela raiz, por se encontrar totalmente envolvida pelo micélio fúngico. Diversos trabalhos desenvolvidos com recurso a inibidores de transportadores auxínicos têm demonstrado que os efeitos morfogénicos derivados das auxinas (dicotomia das raízes laterais) são dependentes do seu gradiente de concentração e da sua distribuição no meristema radicular (Karabaghli-Degron *et al.*, 1998; Kaska *et al.*, 1999). No entanto, convém referir que até ao momento não existem trabalhos que demonstrem claramente o efeito do fungo ectomicorrízico ao nível da concentração e da distribuição das auxinas nas raízes da planta hospedeira.

#### **5.1.1.5 Alteração da expressão génica durante o desenvolvimento ectomicorrízico**

A avaliação da transcrição génica em vários sistemas ectomicorrízicos tem revelado alterações na expressão de genes fúngicos e da planta hospedeira durante a interacção micorrízica. Métodos de hibridação subtractiva supressiva (SSH) (Voiblet *et al.*, 2001; Podila, 2002; Johansson *et al.*, 2004; Krüger *et al.*, 2004; Menotta *et al.*, 2004; Morel *et al.*, 2005), *Differential Display Reverse Transcriptase – PCR* (DDRT-PCR) (Kim *et al.*, 1999) e mais recentemente os *arrays* (*micro* e *macro*) de cDNA (Voiblet *et al.*, 2001; Peter *et al.*, 2003; Johansson *et al.*, 2004; Duplessis *et al.*, 2005; Le Quéré *et al.*, 2005; Santos, 2006; Sebastiana, 2006) têm resultado na identificação de genes regulados pela simbiose (genes SR, *symbiosis regulated genes*). As principais categorias fisiológicas nas quais se incluem estes genes são (i) crescimento e organização celular, (ii) morfogénese, (iii) metabolismo e energia, (iv) síntese e interacção proteica, regulação da transcrição e tradução, (v) transporte celular (de iões, aminoácidos e peptídeos), (vi) citoesqueleto (proteínas membranares estruturais e de sinalização), (vii) processamento de DNA/RNA, (viii) stresse, defesa e morte celular

programada. Estes resultados sugerem que a formação de ectomicorrizas é um processo altamente dinâmico, no qual a planta e o fungo estão constantemente a receber e a enviar sinais, estão expostos a elevados níveis de stresse e sofrem drásticas transformações morfológicas e fisiológicas (Martin *et al.*, 2001b).

Os vários trabalhos de expressão diferencial de genes vieram confirmar o envolvimento de vias de transdução de sinal, responsáveis pela percepção da invasão dos tecidos da planta pelo fungo e pela transmissão dessa informação ao núcleo. Em diferentes associações ectomicorrízicas, foi verificada a sobre-expressão de vários genes potencialmente envolvidos em processos de sinalização, tais como, genes codificantes de GTPases heterotriméricas, proteínas *ras*, calmodulina e proteínas cinase (Voiblet *et al.*, 2001; Podila, 2002; Duplessis *et al.*, 2005; Le Quéré *et al.*, 2005), igualmente detectados no sistema micorrízico *Castanea sativa*-*Pisolithus tinctorius* (Sebastiana, 2006). A elevada homologia de genes sobre-expressos com genes implicados nas respostas de defesa sugere que o contacto entre o fungo ectomicorrízico e a planta hospedeira induz vias de transdução de sinal comuns àquelas activadas por fungos patogénicos, tais como produção de ROS, de resposta hipersensível, de proteínas de resistência, de compostos antimicrobianos (p. e. fitoalexinas) e de transdução de sinal de stresse (Voiblet *et al.*, 2001; Podila, 2002; Peter *et al.*, 2003; Johansson *et al.*, 2004; Krüger *et al.*, 2004; Menotta *et al.*, 2004; Duplessis *et al.*, 2005; Le Quéré *et al.*, 2005; Morel *et al.*, 2005). Estas evidências sugerem que as plantas provavelmente usam programas genéticos comuns em resposta a fungos simbióticos e patogénicos (Guimil *et al.*, 2005). De facto, em todas as combinações ectomicorrízicas estudadas até ao momento não se registaram alterações na expressão diferencial de genes ditos “específicos da micorrização”. A alteração de um padrão de expressão de genes, normalmente expressos nos parceiros em vida livre, sugere que a interacção entre os simbiontes não desencadeie um programa genético específico (Voiblet *et al.*, 2001).

Estudos de expressão diferencial de genes ao longo do processo de micorrização, desde a pré-colonização até à formação de estruturas ectomicorrízicas (manto e rede de Hartig), revelaram que o número de genes fúngicos com expressão diferencial é muito superior comparativamente ao número de genes da planta hospedeira (Duplessis *et al.*, 2005; Le Quéré *et al.*, 2005). Estes estudos evidenciaram igualmente uma maior sobre-expressão durante os primeiros 8 dias após a inoculação, sendo o maior número de genes induzidos entre os 4-8 dias, período coincidente com o desenvolvimento do

manto e da rede de Hartig, seguido pela sua supressão em estádios mais avançados da micorrização.

A indução transiente dos genes da planta tem sido interpretada como uma reacção inicial desta para restringir o crescimento do fungo (Voiblet *et al.*, 2001; Duplessis *et al.*, 2005). De entre os genes que apresentaram sobre-expressão destacam-se os genes codificantes de (i) moléculas ou enzimas anti-oxidantes tais como a glutathione-S-transferase (Podila, 2002; Johansson *et al.*, 2004; Le Quéré *et al.*, 2005), glutathione peroxidase (Podila, 2002) e a superóxido dismutase (Johansson *et al.*, 2004; Morel *et al.*, 2005); (ii) moléculas que actuam na via da sinalização como resposta a estímulos de stresse, como por exemplo as metalotioninas (Peter *et al.*, 2003; Johansson *et al.*, 2004; Krüger *et al.*, 2004), proteínas GRAS (Le Quéré *et al.*, 2005), proteínas cinases (Voiblet *et al.*, 2001; Podila, 2002; Krüger *et al.*, 2004; Duplessis *et al.*, 2005), proteínas *ras* (Voiblet *et al.*, 2001; Podila, 2002; Duplessis *et al.*, 2005), calmodulinas e GTPases heterotriméricas (Voiblet *et al.*, 2001; Duplessis *et al.*, 2005); (iii) proteínas de resistência (PR), como quitinases (Le Quéré *et al.*, 2005), proteínas da família PR-10 (Duplessis *et al.*, 2005; Le Quéré *et al.*, 2005) e de *O*-metiltransferase, que intervém na via biossintética da lenhina e dos fenilpropanóis (Voiblet *et al.*, 2001; Duplessis *et al.*, 2005; Le Quéré *et al.*, 2005).

Recentemente foi avaliada a expressão de genes de *Castanea sativa* e do fungo *Pisolithus tinctorius*, ao fim de 12 horas de contacto, por *microarrays* de cDNA (Santos, 2006; Sebastiana, 2006). Os resultados permitiram a identificação de 32 genes de *Castanea sativa* diferencialmente expressos, em resposta ao contacto com *P. tinctorius*, os quais estão potencialmente envolvidos em processos celulares como a resposta de defesa, a degradação/maturação de proteínas, a modificação da parede celular, o metabolismo primário, a transdução de sinal ou a alteração da organização do citoesqueleto (Sebastiana, 2006). Destes 32 genes, com expressão diferencial, 13 apresentaram sobre-expressão e 19 sub-expressão. Os resultados parecem indicar que: (i) a planta responde ao contacto inicial com o fungo, diminuindo a transcrição de vários genes relacionados com a resposta de defesa, (ii) da interacção entre os dois organismos simbióticos resultam alterações da estrutura da parede celular da planta, possivelmente para permitir o subsequente crescimento do fungo no espaço apoplástico da raiz, (iii) o fungo activa, na planta hospedeira, vias de transdução de sinal que são comuns às activadas por fungos patogénicos, (iv) tal como na maioria das interacções entre plantas

e microrganismos, o citoesqueleto das células radiculares do castanheiro sofrem uma reorganização após o contacto com o micélio do fungo ectomicorrízico, (v) o metabolismo primário e a produção de energia nas células da raiz parecem diminuir em resposta ao contacto com o fungo ectomicorrízico. Em *Pisolithus tinctorius*, foram identificados 40 genes diferencialmente expressos, dos quais 15 apresentavam sobre-expressão e 25 sub-expressão. Estes genes estão potencialmente envolvidos em processos celulares como metabolismo e energia, síntese proteica, organização celular (proteínas membranares estruturais e de sinalização) e resposta de defesa, sugerindo uma elevada actividade metabólica nas hifas do fungo em contacto com a raiz (Santos, 2006).

### 5.1.2 Efeito de fungos saprófitas no desenvolvimento ectomicorrízico

Apesar da micorrização promover um aumento da disponibilidade de nutrientes minerais, importante no crescimento e produtividade vegetal, o estudo da interacção de fungos micorrízicos com outros microrganismos tem sido descurada. A maior parte dos trabalhos tem incidido sobre o efeito da inoculação de fungos saprófitas na micorrização de plantas por fungos arbusculares ou por fungos ectomicorrízicos. De entre as espécies saprófitas estudadas destacam-se as espécies pertencentes aos géneros *Trichoderma* sp. (McAllister *et al.*, 1994; Fracchia *et al.*, 1998; Godeas *et al.*, 1999; Wells & Boddy, 2002; Werner *et al.*, 2002; Fracchia *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2004) e *Fusarium* sp. (McAllister *et al.*, 1994; García-Romera *et al.*, 1998; Fracchia *et al.*, 2000), encontrando-se representadas em menor número as espécies *Wardomyces inflatus*, *Paecilomyces farinosus*, *Gliocladium roseum* (Fracchia *et al.*, 1998; Godeas *et al.*, 1999), *Tricholomopsis rutilans* (Murphy & Mitchell, 2001), *Aspergillus niger* e *Penicillium restrictum* (Fracchia *et al.*, 2004). Os resultados obtidos indicam que, de uma maneira geral, os fungos saprófitas reduzem o crescimento da planta e inibem a colonização das raízes pelo fungo simbiote, comprometendo a micorrização (Fracchia *et al.*, 1998; Godeas *et al.*, 1999; Murphy & Mitchell, 2001; Martinez *et al.*, 2004). No entanto, este efeito nem sempre é observável podendo ocorrer uma resposta antagónica à descrita, a qual depende sobretudo da espécie e estirpe, quer do fungo saprófita quer do simbiote (García-Romera *et al.*, 1998; Fracchia *et al.*, 2000; Werner *et al.*, 2002; Fracchia *et al.*, 2004). A supressão da micorrização pelos fungos saprófitas faz-se sentir

principalmente durante a fase da pré-colonização do desenvolvimento simbiótico, através da inibição da germinação dos esporos e do crescimento das hifas dos fungos micorrízicos (Martinez *et al.*, 2004). Esta inibição resulta da produção de substâncias voláteis e de exsudados solúveis pelo fungo saprófita (Martinez *et al.*, 2004).

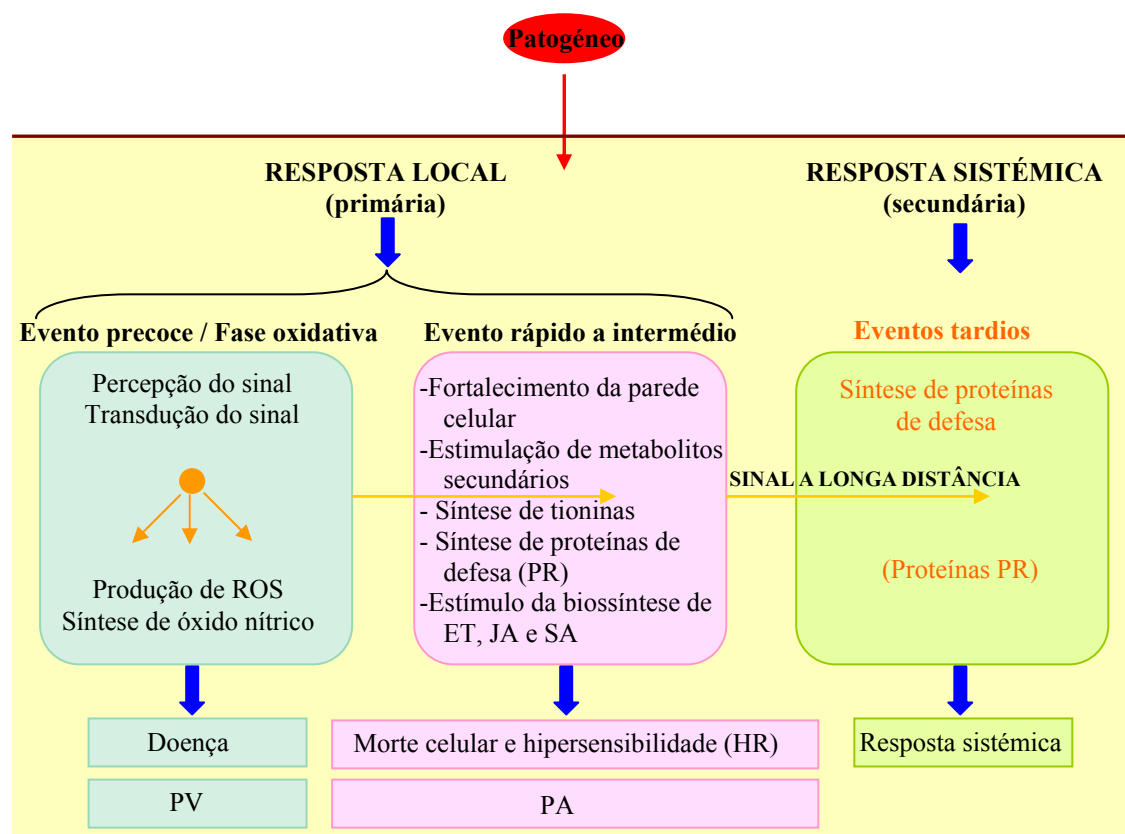
No que concerne especificamente à supressão da formação de ectomicorrizas por fungos saprófitas a maioria dos resultados foram obtidos em estudos de interacção antagonista entre fungos saprófitas e ectomicorrízicos (Shaw *et al.*, 1995; Lindahl *et al.*, 2001). Na interacção entre *Hypholoma fasciculare* e *Suillus variegatus* verificou-se que, dependendo da quantidade de substrato disponível, o fungo *H. fasciculare* apresentava um crescimento superior face ao fungo ectomicorrízico interactuante, impedindo na maioria dos casos a sua colonização do solo e por conseguinte a micorrização das plantas (Lindahl *et al.*, 2001). Este facto reveste-se de elevada importância, atendendo a que os carpóforos de *H. fasciculare* apresentam elevada toxicidade e exibem quantidades não negligenciáveis de triterpenos, alguns dos quais inibidores do crescimento de plantas (Kleinwächter *et al.*, 1999; Akasaka *et al.*, 2005).

O efeito da interacção entre fungos saprófitas existentes no solo e fungos ectomicorrízicos pode também ter repercussões na nutrição mineral das plantas hospedeiras, nomeadamente em azoto e fósforo (Koide & Kabir, 2001; Wu *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2005). Quando os teores destes nutrientes minerais no solo não são limitativos, os fungos saprófitas aumentam a sua disponibilidade para os fungos ectomicorrízicos resultando numa melhoria do estado nutricional da planta hospedeira. Este aumento é sobretudo importante ao nível dos nutrientes minerais que derivam de polímeros complexos, os quais a maioria dos fungos ectomicorrízicos, ao contrário dos saprófitas, não consegue hidrolisar (Koide & Kabir, 2001; Wu *et al.*, 2005). Quando os solos apresentam teores limitativos neste nutrientes, ocorre competição directa entre os fungos saprófitas e ectomicorrízicos, com prejuízos na nutrição mineral das plantas hospedeira (Koide & Kabir, 2001).

### **5.1.3 Indução de respostas de defesa na planta**

Quando infectadas por patogéneos, as plantas podem activar uma vasta gama de mecanismos de defesa (Figura 5.4). O reconhecimento de moléculas produzidas pelo patogéneo (eliciadores) ao nível de proteínas receptores das células pode conduzir à

activação de cinases e ao despoletar de cascatas de fosforilação, implicando fosfatases, proteínas G e fluxos iónicos. Estes eventos estimulam o aparecimento de um padrão característico de resposta de defesa por parte da planta, o qual inclui (i) a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS), (ii) a resposta hipersensível (HR), (iii) a indução de genes de defesa ou relacionados com a patogénese (genes PR), (iv) o reforço da parede celular (deposição de calose, lenhina, glicoproteínas ricas em hidroxiprolina), (v) a biossíntese de ácido jasmónico (JA), e/ou de etileno (ET), e/ou de ácido salicílico (SA), (vi) a produção de metabolitos secundários (fitoalexinas antimicrobianas) (vii) e de enzimas líticas (quitinases e glucanases). Por último e após estes acontecimentos, a planta poderá induzir a resistência sistémica adquirida (SAR) e, eventualmente, a emissão de sinais para outras plantas (Dixon & Lamb, 1990; Baker & Orlandi, 1995; Doke *et al.*, 1996; Mehdy *et al.*, 1996; Lamb & Dixon, 1997).



**Figura 5.4** Principais etapas da resposta de defesa de plantas ao ataque por patógenos. ROS – espécies reactivas de oxigénio; PV – patogénese virulenta; PA – patogénese avirulenta, ET – etileno; JA – ácido jasmónico; SA – ácido salicílico; HR – resposta hipersensível; PR – proteínas de resistência (adaptado de Cordeiro & de Sá, 1999).

Os patógenos virulentos, por falta de especificidade no reconhecimento, escapam à activação rápida destes mecanismos de defesa, podendo multiplicar-se e provocar a doença (interacção compatível ou susceptível). Os patógenos avirulentos activam rapidamente a cadeia de eventos de transdução de sinal que culminam na activação de mecanismos de defesa, como a HR e a SAR, e no impedimento do crescimento do patógeno (interacção incompatível ou resistente) (Dixon & Lamb, 1990; Kapulnik *et al.*, 1996).

Recentemente, de acordo com o modelo não-hospedeiro, foi sugerido que, o desenvolvimento de HR, nem sempre ocorre após infecção por um patógeno (Mysore & Ryu, 2004; Reignault & Sancholle, 2005). O patógeno poderá não conseguir penetrar, nem multiplicar-se nas células da planta, e por conseguinte não ocorre o desenvolvimento de sintomas por parte da planta. Neste caso, o patógeno não consegue ultrapassar os mecanismos de defesa passivos (barreira física desenvolvida pela planta, tais como reforço da parede celular, produção de compostos antimicrobianos e de metabolitos secundários), nem os mecanismos de defesa activos despoletados na planta.

### 5.1.3.1 Indução de respostas de defesa na planta por fungos ectomicorrízicos

À semelhança do observado para a interacção planta-fungo patogénico, a inoculação de plantas com fungos ectomicorrízicos inclui a indução/supressão de mecanismos associados à resposta de defesa despoletada na planta hospedeira. Estes mecanismos parecem desempenhar um papel fulcral na determinação da compatibilidade simbiótica, no desenvolvimento e no funcionamento ectomicorrízico (Martin *et al.*, 2001b). O tratamento de células de *Picea abies* com eliciadores da parede celular dos fungos ectomicorrízicos *Amanita muscaria* (Schwacke & Hager, 1992) e *Hebeloma crustuliniforme* (Schwacke & Hager, 1992; Salzer *et al.*, 1996) despoleta muitas reacções bioquímicas de resistência típicas de um ataque patogénico incompatível. Logo após o início do tratamento ocorre o efluxo de iões de  $\text{Cl}^-$  e de  $\text{K}^+$  para o meio de cultura, seguindo-se o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para o interior das células (Schwacke & Hager, 1992; Salzer *et al.*, 1996). Quatro minutos após a adição dos eliciadores, verifica-se a fosforilação e a desfosforilação de proteínas (Salzer *et al.*, 1996), a alcalinização do meio extracelular e a acumulação transiente de ROS, nomeadamente de peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Schwacke & Hager, 1992; Salzer *et*

*al.*, 1996). Foi ainda sugerido que as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), responsável pela dismutação dos aniões superóxido em oxigénio e  $H_2O_2$ , e a catalase (CAT), responsável pela decomposição do  $H_2O_2$ , poderiam estar envolvidas na regulação da produção destas ROS (Schwacke & Hager, 1992). Esta similaridade com as vias de transdução de sinal, relacionadas com a percepção da invasão dos tecidos da planta por patogéneos incompatíveis, sugere que nos estádios iniciais da micorrização o fungo ectomicorrízico secreta eliciadores que induzem uma resposta de defesa na planta hospedeira (Hebe *et al.*, 1999). Esta hipótese tem vindo a ser corroborada por diversos autores que referem processos típicos de resposta de defesa de plantas durante a interação planta-fungo ectomicorrízico. Observações microscópicas de ultraestruturas radiculares de *Pinus nigra* inoculadas com uma estirpe de *Suillus collinitus* evidenciaram uma acumulação de um constituinte da calose, a  $\beta$ -1,3-glucanase, especificamente sintetizada pela planta em situações relacionadas com o ataque de patógenos (Bonfante *et al.*, 1998). Em diversos sistemas ectomicorrízicos, a acumulação localizada de compostos fenólicos nas paredes celulares das plantas restringe a progressão do fungo durante a formação das estruturas ectomicorrízicas, sobretudo da rede de Hartig (Weiss *et al.*, 1997; Feugey *et al.*, 1999; Weiss *et al.*, 1999). De facto, durante o início da progressão do fungo pelos espaços apoplásticos da raiz para a formação da rede de Hartig, a fenilalanina amónia liase (PAL), enzima envolvida na via biossintética de compostos secundários fenólicos, apresenta um aumento transiente da sua actividade, acompanhado por um aumento da expressão de genes que codificam proteínas de resistência PR (Feugey *et al.*, 1999). Face a estes resultados, os autores sugeriram que a indução de resposta de defesa, despoletada na planta hospedeira, durante a invasão intercelular da raiz pelo fungo impede a formação da rede de Hartig (Feugey *et al.*, 1999).

Ao contrário do que sucede na interação incompatível planta-patogéneo, na interação planta-fungo ectomicorrízico parece ocorrer a supressão da rápida resposta de defesa despoletada na planta hospedeira (Salzer *et al.*, 1996). Em *P. abies* esta supressão parece estar relacionada com a produção de quitinases (enzimas hidrolíticas vulgarmente sintetizadas pela planta após um ataque patogénico), que inactivam os eliciadores (fragmentos de quitina) secretados pelo fungo ectomicorrízico (Salzer *et al.*, 1997a; Salzer *et al.*, 1997b). Estes resultados sugeriram que esta inactivação poderá constituir um pré-requisito para o reconhecimento de uma interação compatível entre

planta e fungo ectomicorrízico, nos quais a quitina é uma parte constituinte da parede celular. É também proposto que a activação da produção de quitinases na planta hospedeira possa favorecer o crescimento das hifas nos espaços intercelulares da raiz, permitindo a formação de estruturas ectomicorrízicas (Sauter & Hager, 1989). Esta hipótese é sustentada pelo facto da formação das micorrizas ser aumentada na presença de concentrações elevadas de quitinases (Albrecht *et al.*, 1994). Para além das quitinases, as auxinas produzidas pelo fungo ectomicorrízico durante o processo de colonização, têm revelado possuir um papel na inibição/atenuação da resposta de defesa induzida na planta hospedeira. Em cultura de células de *Picea abies*, foi demonstrado que os eliciadores de fungos ectomicorrízicos provocavam alterações na actividade de peroxidases, que por sua vez eram atenuadas pelas auxinas sintetizadas pelo fungo (Mensen *et al.*, 1998).

Curiosamente, a indução de resposta de defesa na planta hospedeira observada nos estádios iniciais da micorrização nem sempre é seguida pela sua supressão/atenuação nos estádios mais avançados. Em co-culturas estabelecidas entre “callus” de *Picea abies* com *Lactarius deterrimus* ou com *Suillus variegatus* foi observado o desenvolvimento de reacções típicas de uma resposta hipersensível (HR), ocorrendo uma necrose das células de *P. abies* que posteriormente progredia para uma lesão necrótica (Sirrenberg *et al.*, 1995). Deste modo, a resposta de defesa das plantas hospedeiras induzida pelos fungos ectomicorrízicos parece ser bastante diversificada e por vezes contraditória, sobretudo no que concerne à atenuação da resposta de defesa nos estádios mais avançados de micorrização. É proposto que para as diferentes combinações planta-fungo ectomicorrízico existam também diferentes mecanismos bioquímicos e moleculares de regulação da micorrização (Martin *et al.*, 1999), o que permitirá explicar a grande contradição de resultados referenciados. Para além da interacção do genótipo do fungo e da planta convém ainda considerar que a interacção destes com o ambiente pode ser igualmente determinante na resposta de defesa da planta hospedeira.

### **5.1.3.2 Indução de respostas de defesa na planta por fungos saprófitas**

Os estudos sobre o efeito directo da inoculação de fungos saprófitas em plantas são muito escassos. No entanto, os poucos trabalhos realizados neste âmbito têm mostrado que a inoculação de fungos saprófitas induz mecanismos associados à resposta

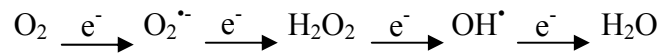
de defesa na planta hospedeira, sobretudo nas primeiras horas de interação (Asiegbu *et al.*, 1999; Yedidia *et al.*, 1999), seguida da sua supressão (Yedidia *et al.*, 1999). Em plântulas de *Cucumis sativus* inoculadas com o fungo saprófita *Trichoderma harzianum*, vulgarmente utilizado como agente biológico no controlo de patógenos do solo, foi detectado um aumento da síntese de quitinase e de peroxidase ao fim de 48-72 horas de inoculação, situação que se reverteu ao fim de 120 horas (Yedidia *et al.*, 1999). Cortes transversais de raízes inoculadas ao fim de cinco dias apresentavam ainda um reforço da parede celular pela deposição de calose e um aumento de infiltrações de celulose, que constituem respostas típicas desenvolvidas pela planta após ataque de patógenos. O desenvolvimento de reacções características de uma resposta hipersensível (HR) foi evidenciado em raízes de *Pinus sylvestris* inoculadas com os fungos saprófitas *Phlebiopsis gigantea* e *Marasmius androsaceus*, as quais apresentaram necrose após 9 dias de inoculação (Asiegbu *et al.*, 1999). Foi igualmente observado um aumento da concentração de peroxidase em raízes inoculadas com *P. gigantea* ao fim de 3 dias. Contudo, estas reacções nem sempre foram observadas após inoculações com fungos saprófitas, como é o caso das inoculações de *P. sylvestris* com *Trichoderma aureoviride* e *Coriolus versicolor* (Asiegbu *et al.*, 1999).

#### 5.1.4 Stresse oxidativo

Em interações planta-patógeno, a activação dos mecanismos de defesa da planta frequentemente conduz a uma rápida produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS), tais como o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), o ião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e, em menor escala o radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) (Mehdy *et al.*, 1996; Lamb & Dixon, 1997). Este choque ou stresse oxidativo tem vindo a ser observado em plantas que estiveram em contacto com vários tipos de microrganismos patogénicos, incluindo fungos, bactérias e vírus, e ainda em cultura de células sujeitas a eliciadores, tais como paredes celulares de agentes patogénicos (Wojtaszek, 1997).

A produção de ROS é um processo que ocorre normalmente no metabolismo celular e não somente após imposição de um stresse biótico ou abiótico (Tabela 5.2). A sua produção pode ocorrer directa ou indirectamente como resultado de várias reacções celulares, estando todos os compartimentos da célula implicados na sua geração (Neill *et al.*, 2002). O processo através do qual o oxigénio molecular sofre redução sequencial,

levando à formação de vários intermediários reactivos, pode ser representado da seguinte forma:



**Tabela 5.2** Mecanismos responsáveis pela produção e remoção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) em plantas (adaptado de Mittler, 2002).

Mecanismo	Localização celular	ROS produzida/removida
<b>Produção</b>		
Fotossíntese, TE e PSI ou PSII	Cl	$\text{O}_2^{\cdot-}$
Respiração, TE	Mit	$\text{O}_2^{\cdot-}$
Glicolato oxidase	Per	$\text{H}_2\text{O}_2$
Clorofila excitada	Cl	$\text{O}_2^1$
NADPH oxidase	MP	$\text{O}_2^{\cdot-}$
B-oxidação dos ácidos gordos	Per	$\text{H}_2\text{O}_2$
Oxalato oxidase	Apo	$\text{H}_2\text{O}_2$
Xantina oxidase	Per	$\text{O}_2^{\cdot-}$
Peroxidases, $\text{Mn}^{2+}$ e NADH	PC	$\text{H}_2\text{O}_2$ , $\text{O}_2^{\cdot-}$
Amina oxidase	Apo	$\text{H}_2\text{O}_2$
<b>Remoção</b>		
Superóxido dismutase	Cl, Cit, Mit, Per, Apo	$\text{O}_2^{\cdot-}$
Ascorbato peroxidase	Cl, Cit, Mit, Per, Apo	$\text{H}_2\text{O}_2$
Catalase	Per	$\text{H}_2\text{O}_2$
Glutationa peroxidase	Cit	$\text{H}_2\text{O}_2$ , ROOH
Peroxidases	PC, Cit, Vac	$\text{H}_2\text{O}_2$
Tiorredoxina peroxidase	Cl, Cit, Mit	$\text{H}_2\text{O}_2$
Ácido ascórbico	Cl, Cit, Mit, Per, Apo	$\text{H}_2\text{O}_2$ , $\text{O}_2^{\cdot-}$
Glutationa	Cl, Cit, Mit, Per, Apo	$\text{H}_2\text{O}_2$
$\alpha$ -Tocoferol	Membranas	ROOH, $\text{O}_2^1$
Carotenóides	Cl	$\text{O}_2^1$

(Apo - apoplasto; Cit - citosol; Cl - cloroplasto; Mit - mitocôndria; MP - membrana plasmática; Per - peroxissoma; PC - parede celular; PS - fotossistema; TE - transporte de electrões; Vac - vacúolo).

A imposição de um stresse biótico ou abiótico leva ao aumento dos níveis de ROS, pelas mesmas vias atrás referidas e também por vias enzimáticas, tais como, (i) NADPH oxidase, localizada na membrana plasmática, (ii) pelas peroxidases, localizadas nos espaços apoplásticos e ligadas covalentemente ou ionicamente à parede celular, e (iii) pela xantina oxidase e amina oxidase (Neill *et al.*, 2002; Apel & Hirt,

2004; Torres *et al.*, 2006). Na interação compatível, imediatamente após a infecção pelo patógeno ocorre um aumento transiente de ROS (fase I), o qual parece corresponder a uma reação biológica inespecífica. Na interação incompatível, esta fase de produção é seguida por uma outra (fase II), de maior duração e intensidade, entre as 2-3 até 5-6 horas após a infecção. Esta segunda fase de produção é acompanhada algumas horas mais tarde pelo desenvolvimento da resposta hipersensível (HR) que se traduz pela morte das células em redor do local de infecção (Baker & Orlandi, 1995; Lamb & Dixon, 1997). Deste modo, a presença de ROS parece ser essencial para o controlo da infecção, desempenhando um papel importante na morte do agente patogénico, no *cross-linking* de glicoproteínas da parede celular (prevenindo a invasão e a propagação do patógeno), na HR e na indução SAR (Mehdy *et al.*, 1996; Lamb & Dixon, 1997; Torres *et al.*, 2006). Uma outra função destas espécies químicas é a de constituírem segundos mensageiros, responsáveis pela activação de genes associados à patogénese e genes envolvidos na biossíntese de fitoalexinas (Inzé & Van Montagu, 1995; Torres *et al.*, 2006).

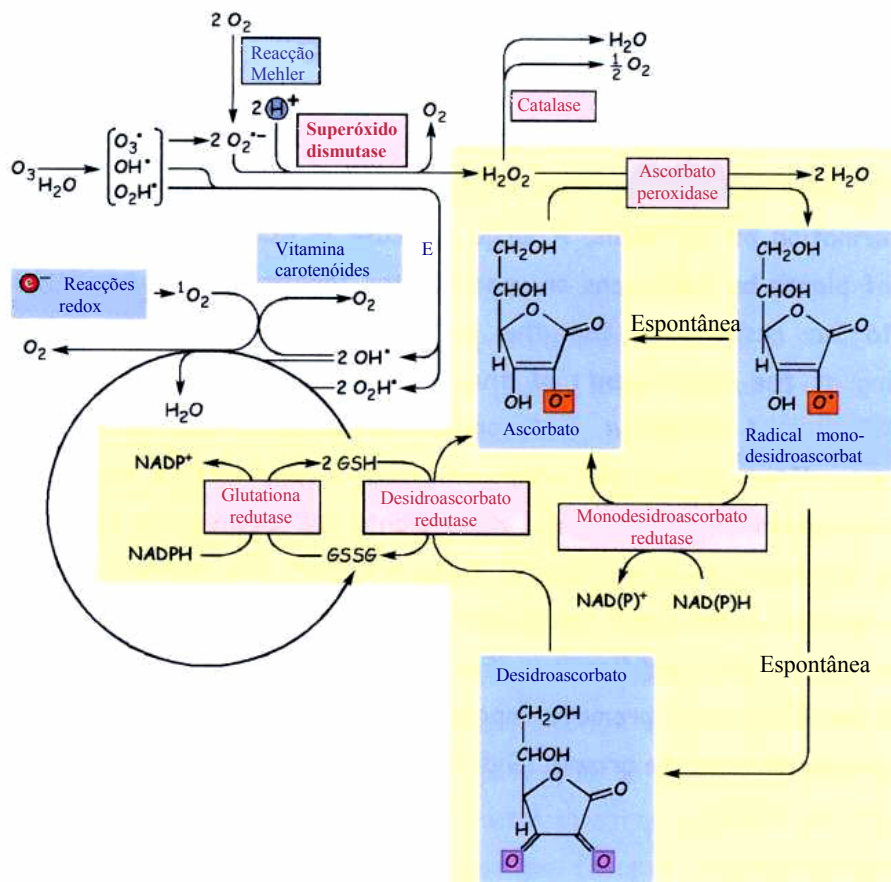
A manutenção intracelular dos níveis normais de ROS é de extrema importância; caso contrário, poderá ocorrer a morte celular derivado da elevada toxicidade exibida pelas ROS. Um balanço regulado entre a produção e a destruição de ROS mantém a eficiência e função metabólica durante as condições normais e de stresse (biótico ou abiótico), permitindo igualmente regular as vias de sinalização, uma vez que as ROS podem funcionar como moléculas sinalizadoras (Mittler, 2002). As plantas desenvolveram vários mecanismos de defesa, enzimáticos e não enzimáticos, que regulam a concentração intracelular ou que minimizam a toxicidade destes radicais de oxigénio (Tabela 5.2). Os antioxidantes não enzimáticos são geralmente pequenas moléculas que podem ser hidrofílicas, tais como o ascorbato (vitamina C) e a glutatona, ou lipofílicas, como  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) e os carotenóides (Apel & Hirt, 2004). As poliaminas e os flavonóides também oferecem protecção contra as espécies reactivas (Gaspar *et al.*, 2002).

Os mecanismos antioxidantes enzimáticos são constituídos por enzimas com a capacidade de remover ou neutralizar os radicais livres. Nestes mecanismos incluem-se a enzima superóxido dismutase (SOD), responsável pela eliminação do  $O_2^{\cdot-}$ , e as enzimas ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPX), glutatona redutase (GR), monodesidroascorbato redutase (MDHAR) e desidroascorbato

redutase (DHAR), participando todas elas na decomposição do  $H_2O_2$  (Asada, 1999; Mittler, 2002; Apel & Hirt, 2004).

A SOD é responsável pela dismutação do anião superóxido em peróxido de hidrogénio, eliminando assim uma espécie reactiva mas conduzindo à produção de uma outra igualmente nociva (Mittler, 2002). A remoção do  $H_2O_2$  pode ser efectuada pela CAT, que catalisa a decomposição directa do  $H_2O_2$  em água e oxigénio. A acção combinada de SOD e CAT resulta na conversão de radicais potencialmente perigosos como  $H_2O_2$  e  $O_2^{\cdot-}$  em água e oxigénio, evitando possíveis danos celulares (Scandalios, 1993).

Como a CAT se encontra confinada aos peroxissomas, a remoção do  $H_2O_2$  nos cloroplastos e outros compartimentos subcelulares, nomeadamente no citosol e mitocôndrias, é efectuada por um outro conjunto de enzimas que protagonizam uma série de reacções que compõem o designado ciclo do ascorbato-glutationa (Figura 5.5) (Jiménez *et al.*, 1997; Asada, 1999; Mittova *et al.*, 2000; Mittler, 2002).



**Figura 5.5** Ciclo do ascorbato-glutationa. Vias do sistema de defesa antioxidante, evidenciando enzimas antioxidantes (representadas a vermelho) e antioxidantes não enzimáticos. O ciclo do ascorbato-glutationa encontra-se sombreado a amarelo (adaptado de Bray *et al.*, 2000).

De acordo com este ciclo, o  $H_2O_2$  é reduzido pelo ascorbato a água, numa reacção catalizada pela APX, ocorrendo a concomitante geração de radicais de monodesidroascorbato (MDHA) (Figura 5.5). Por sua vez, o radical MDHA pode ser convertido espontaneamente em ascorbato e desidroascorbato (DHA) ou, alternativamente, ser reduzido pela ferredoxina ou pela NAD(P)H numa reacção catalizada pela MDHAR. De forma a regenerar o ascorbato, a enzima DHAR utiliza a glutatona para reduzir o DHA. A glutatona oxidada é então regenerada pela GR utilizando equivalentes redutores do NADPH (Mittler, 2002).

### 5.1.5 Objectivos

À semelhança do observado para a interacção incompatível planta-patogéneo, a indução de mecanismos de resposta de defesa na planta hospedeira face à inoculação com fungos ectomicorrízicos e saprófitas tem vindo a ser sugerida. O esclarecimento destes processos de defesa permitirá, no caso dos fungos ectomicorrízicos, elucidar o envolvimento de ROS na regulação do desenvolvimento simbiótico e averiguar o papel dos fungos saprófitas como agentes causadores de stresse na planta. Neste trabalho, foi pretendido o estudo da interacção entre raízes de *Castanea sativa* e o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* ou o fungo saprófita *Hypholoma fasciculare*, em termos de resposta de defesa dos organismos intervenientes (planta e fungo).

Na **interacção estabelecida entre *C. sativa* - *P. tinctorius*** foi avaliada:

- A capacidade de adesão das hifas de *P. tinctorius* às raízes de castanheiro, evidenciada por microscopia electrónica de varrimento;
- Alterações de produção de ROS ( $H_2O_2$  e  $O_2^{\cdot-}$ ) e de enzimas de stresse oxidativo (catalase e superóxido dismutase), em raízes de castanheiro durante as primeiras 48 horas de interacção com *P. tinctorius*;
- A resposta de *P. tinctorius* face à presença de extractos radiculares de castanheiro eliciados pelo mesmo fungo, com diferentes tempos de contacto raiz-fungo. Esta resposta foi avaliada em termos de capacidade de crescimento de micélio.

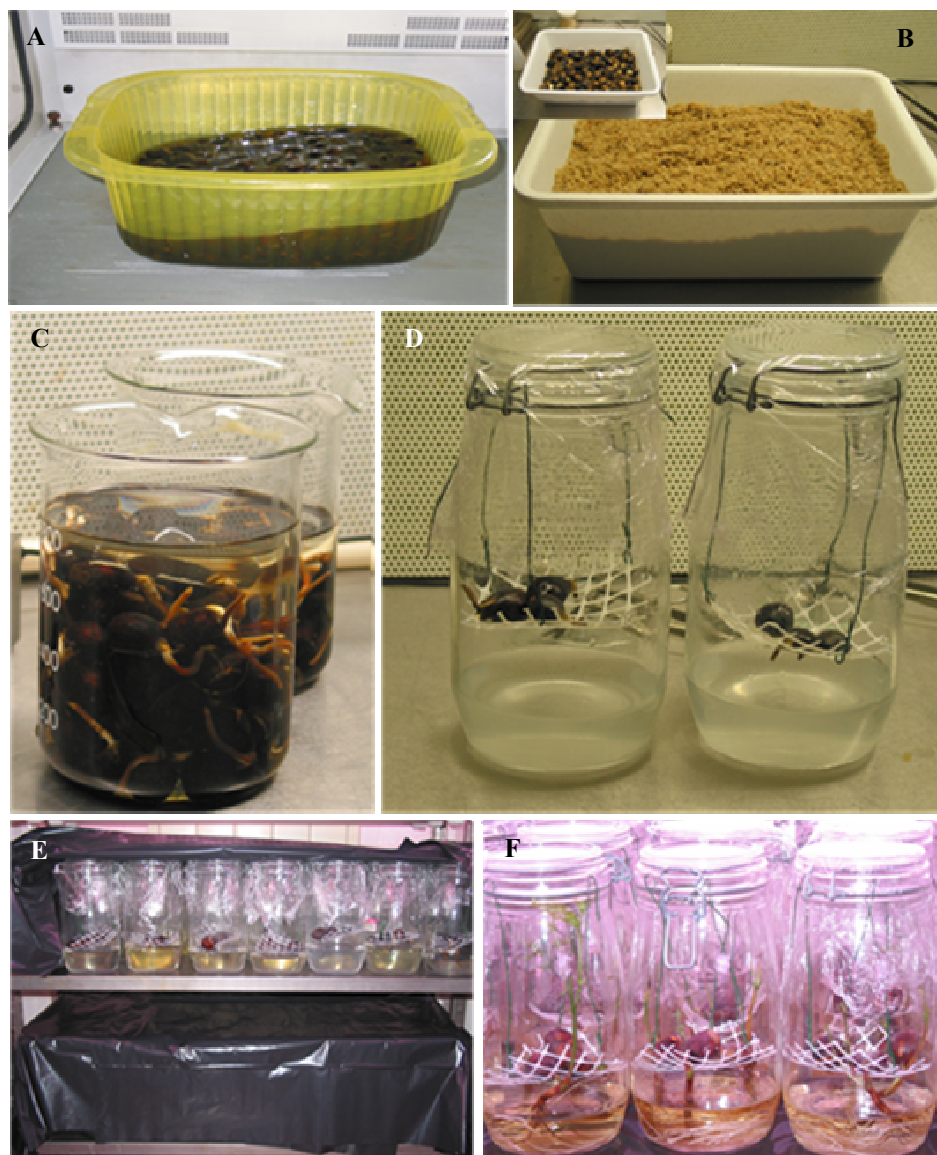
Na **interacção estabelecida entre *C. sativa* - *H. fasciculare*** foi avaliada:

- A capacidade de adesão das hifas de *H. fasciculare* às raízes de castanheiro, evidenciada por microscopia electrónica de varrimento;

- Modificações estruturais nas raízes do castanheiro decorrentes da inoculação com *H. fasciculare*, assim como o aparecimento de sintomas indicadores de situações de stresse/doença;
- Alterações de produção de ROS ( $H_2O_2$  e  $O_2^{\cdot-}$ ) e de enzimas de stresse oxidativo (catalase e superóxido dismutase), em raízes de castanheiro durante as primeiras 48 horas de interação com *H. fasciculare*;
- O possível envolvimento de hidrofobinas de *H. fasciculare* no processo de adesão às raízes de castanheiro. Este estudo foi iniciado pela identificação e caracterização de um gene codificante de hidrofobina, estando ainda em progresso a avaliação da sua expressão no decurso da interação *C. sativa* – *H. fasciculare*.

## 5.2 RESULTADOS

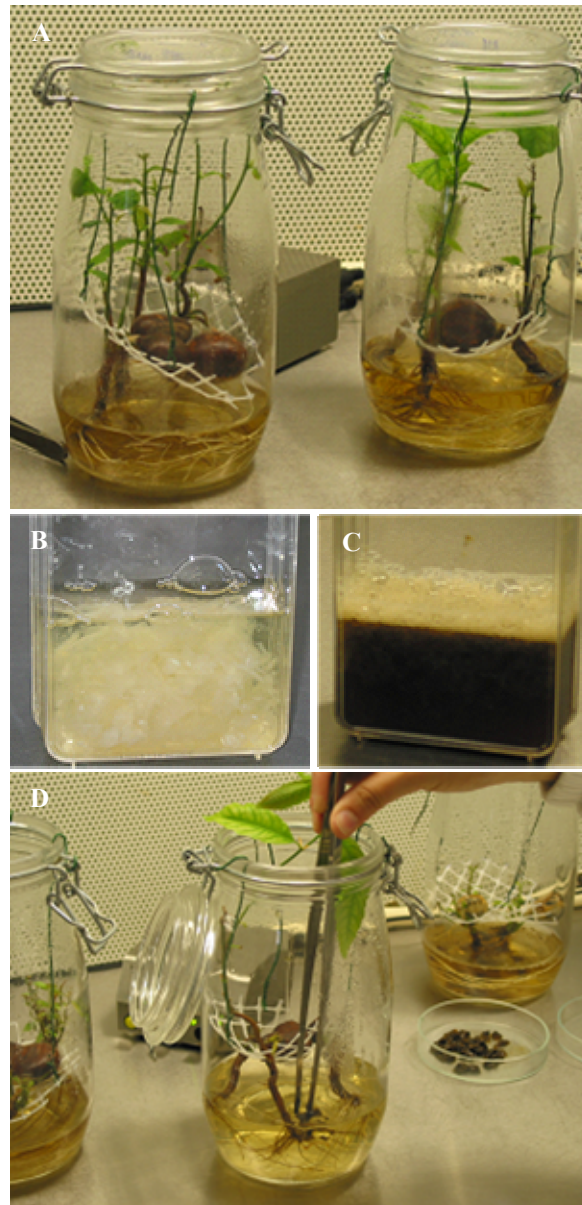
O estudo da interação entre raízes de *Castanea sativa* e o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* ou o fungo saprófita *Hypholoma fasciculare* foi realizado em plantas com cerca quatro meses, crescidas em sistema hidropónico, e que apresentavam um sistema radicular bem desenvolvido (Figura 5.6).



**Figura 5.6** Cultivo de plântulas de *Castanea sativa* em cultura hidropónica.

Sementes, desinfectadas superficialmente com hipoclorito de sódio [5% (p/v) cloro activo], sob agitação (100 rpm) (A), foram estratificadas em tabuleiros, entre camadas de areia de quartzo (B). Após germinação, as sementes foram de novo desinfectadas superficialmente, em hipoclorito de sódio [2,5% (p/v) cloro activo] (C), tendo sido removido a porção apical da radícula com 4 cm. Após a poda radicular, as sementes foram depositadas sobre uma rede de plástico, previamente inserida nos frascos de cultura (D) e as culturas foram mantidas no escuro, a 19°C (E). Após o aparecimento das primeiras folhas e de um sistema radicular desenvolvido, as culturas de plântulas foram submetidas a um fotoperíodo de 16h, à mesma temperatura.

Alíquotas de micélio de *P. tinctorius* ou *H. fasciculare*, correspondentes a 4 g de peso fresco, foram transferidas para frascos contendo as plântulas de *C. sativa* (Figura 5.7). Os controlos foram efectuados, utilizando o mesmo procedimento, mas sem adicionar micélio.



**Figura 5.7** Inoculação de plântulas de castanheiro com *Pisolithus tinctorius* ou *Hypholoma fasciculare*. Plântulas de castanheiro cultivadas em sistema hidropónico, sob fotoperíodo de 16h, a 19°C (A) foram eliciadas com micélio de *Hypholoma fasciculare* (B) ou de *Pisolithus tinctorius* (C) crescidos em meio MMN, no escuro, a 23-25°C. Após a inoculação com o fungo (D), as plântulas foram mantidas nas mesmas condições.

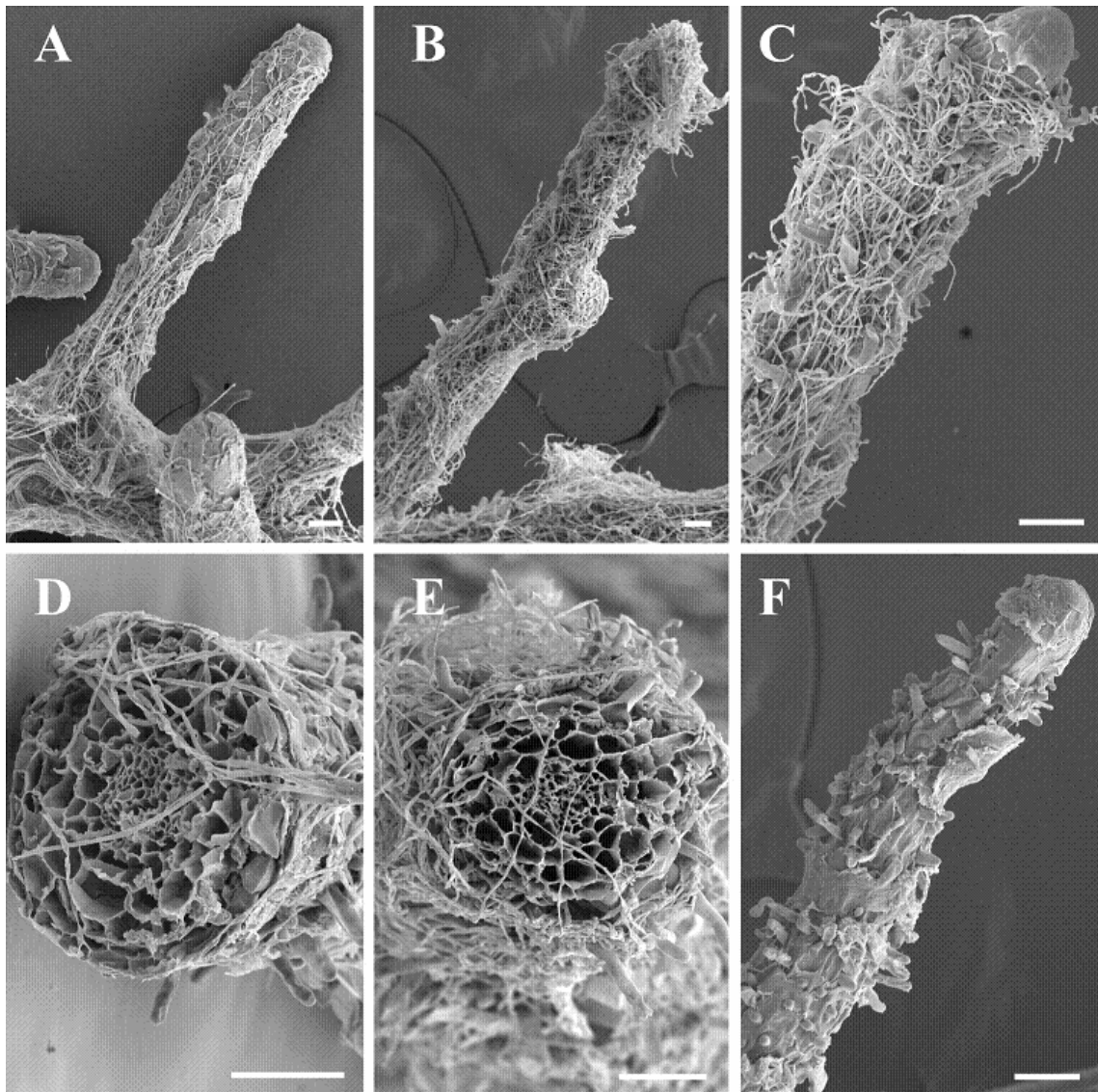
### 5.2.1 Interação *Castanea sativa* – *Pisolithus tinctorius*

A resposta das plântulas de castanheiro à inoculação com o fungo ectomicorrízico *P. tinctorius* foi avaliada durante as primeiras 48 horas de contacto raiz-fungo. Foram avaliadas a capacidade de adesão do fungo à raiz, a produção de ROS e alterações da actividade de enzimas de stresse oxidativo. Os ensaios foram efectuados em raízes de castanheiro eliciadas e não eliciadas (controlo) para os mesmos tempos de interacção.

A resposta do fungo ectomicorrízico *P. tinctorius* à presença das raízes de castanheiro foi igualmente estudada durante as primeiras 48 horas de contacto raiz-fungo. Para tal avaliou-se o efeito do extracto proteico de raízes de castanheiro eliciadas no crescimento do fungo.

#### 5.2.1.1 Capacidade de adesão de *P. tinctorius* a raízes de castanheiro

A capacidade do fungo *P. tinctorius* em aderir à superfície de raízes de castanheiro foi avaliada por microscopia electrónica de varrimento, durante as horas iniciais de contacto entre os simbiontes (Figura 5.8). Após duas horas de contacto é já evidente a existência de hifas adsorvidas à superfície das raízes de *C. sativa*, especialmente das raízes laterais (Figura 5.8A,D). A densidade das hifas aderentes à superfície da raiz aumenta ainda com o tempo de contacto (Figura 5.8B,C), parecendo a adoração das hifas ocorrer em todo o comprimento da raiz, à excepção do ápice (Figura 5.8C). Após 12 horas de eliciação, a maioria das raízes laterais exhibe várias camadas de hifas, originando uma estrutura semelhante ao manto vulgarmente presente em raízes micorrizadas (Smith & Read, 1997) (Figura 5.8B). Contrariamente, a observação de secções transversais da raiz após 24 horas de eliciação, evidenciou não terem ocorrido alterações anatómicas significativas, não sendo observado manto bem desenvolvido nem rede de Hartig (Figura 5.8E). Raízes de plântulas de castanheiro não eliciadas encontram-se desprovidas de hifas adsorvidas à sua superfície (Figura 5.8F).



**Figura 5.8** Aspectos da interacção entre raízes de *Castanea sativa* e *Pisolithus tinctorius*, 2h (A), 12h (B) e 24h (C) após a eliciação, observados por microscopia electrónica de varrimento. Secções transversais de raízes após 2h (D) e 24h (E) de contacto com o micélio. Como controlo, foram utilizadas plântulas não eliciadas (F). Barra, 50µm.

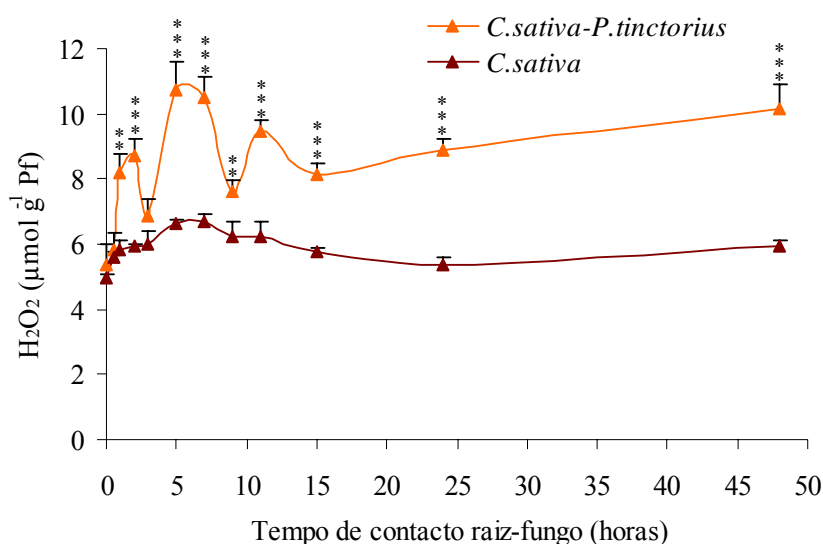
### 5.2.1.2 Produção de espécies reactivas de oxigénio

A produção de espécies reactivas de oxigénio, em raízes de castanheiro inoculadas com *P. tinctorius*, foi avaliada pela quantificação espectrofotométrica de  $H_2O_2$  e a detecção histoquímica de  $O_2^{\cdot-}$ .

#### *Peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ )*

A avaliação da produção de  $H_2O_2$  foi efectuada em raízes de *C. sativa* nas primeiras horas de contacto (0 - 48h) com o fungo *P. tinctorius*, tendo sido utilizado

como controlo raízes de castanheiro não eliciadas para os mesmos tempos de interacção. Os resultados evidenciam a existência de três picos de produção de  $H_2O_2$  (Figura 5.9; Tabela 5.3). O primeiro pico foi observado ao fim de 2 horas de inoculação, e corresponde a um aumento significativo de 1,5 vezes relativamente ao observado em raízes de plântulas após 0,5 horas de eliciação. Após o primeiro pico, os níveis de  $H_2O_2$  decresceram, para valores semelhantes aos determinados em raízes não eliciadas, ao fim de 3 horas de inoculação. Um segundo pico de produção de  $H_2O_2$  foi observado ao fim de 5 horas após a inoculação, e correspondeu ao aumento mais significativo (1,6 vezes relativamente ao determinado em plântulas 3 horas após a inoculação). O terceiro pico de produção de  $H_2O_2$ , observado ao fim de 11 horas após a inoculação, correspondeu a um aumento de 1,2 vezes, relativamente ao observado em plântulas 9 horas após a eliciação, não sendo, contudo, esta diferença estatisticamente diferente. Após um ligeiro decréscimo observado às 15 horas, os níveis de  $H_2O_2$  apresentaram uma leve tendência para aumentar, até às 48 horas de inoculação, não sendo o seu valor estatisticamente diferente do observado em raízes 15 horas após a inoculação.



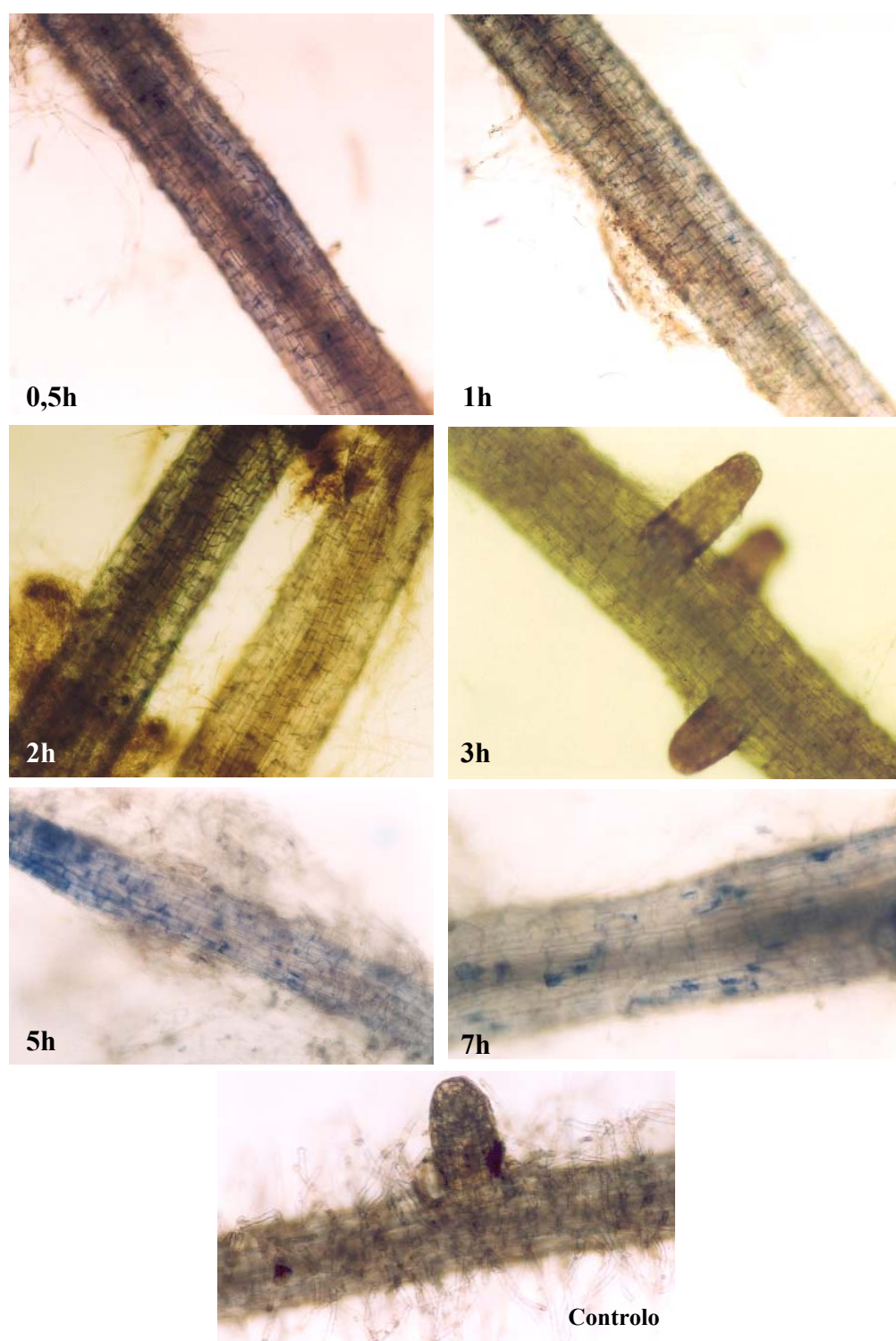
**Figura 5.9** Quantificação de  $H_2O_2$  em raízes de *Castanea sativa* no decurso da eliciação com *Pisolithus tinctorius* (*C. sativa* - *P. tinctorius*). Raízes de plântulas não inoculadas foram utilizadas como controlo (*C. sativa*). A barra indica média  $\pm$  ep (n=3). As diferenças estatisticamente significativas entre plântulas inoculadas e não inoculadas, para o mesmo tempo de inoculação, são indicados por \*\* para  $p<0,01$ ; \*\*\* para  $p<0,001$ .

**Tabela 5.3** Níveis de  $H_2O_2$  em raízes de *Castanea sativa* no decurso das primeiras 48 horas após a eliciação com *Pisolithus tinctorius*. Os valores são apresentados na forma média  $\pm$  desvio padrão (n=3). Valores com a mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de  $p < 0,05$ .

Tempo (h)	[ $H_2O_2$ ] ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ Pf)	Significância
0	5,3 $\pm$ 1,9	f
0,5	5,8 $\pm$ 1,4	ef
1	8,2 $\pm$ 1,7	bcde
2	8,7 $\pm$ 1,5	abcd
3	6,9 $\pm$ 1,5	def
5	10,8 $\pm$ 2,4	a
7	10,5 $\pm$ 1,7	ab
9	7,6 $\pm$ 1,0	cdef
11	9,5 $\pm$ 0,9	abcd
15	8,1 $\pm$ 0,9	bcde
24	8,5 $\pm$ 1,0	abcd
48	9,3 $\pm$ 2,1	abc

### Anião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ )

Adicionalmente ao  $H_2O_2$  foi igualmente avaliada existência de alterações do teor do anião superóxido, pela sua detecção histoquímica através do método de redução do NBT. Nos locais onde ocorre a produção de  $O_2^{\bullet-}$  surge uma coloração azulada, resultante da redução do NBT a formazano, pelo anião superóxido. Raízes de *C. sativa* inoculadas com o fungo *P. tinctorius* foram analisadas durante as primeiras horas de contacto (0,5 - 7h), utilizando como controlo raízes de castanheiro não eliciadas. O contacto com o fungo induziu a produção de anião superóxido, sobretudo em raízes recém-formadas (secundárias) (Figura 5.10). Esta produção, dependente do tempo de inoculação, apresentou dois picos de maior intensidade. No primeiro pico, observado ao fim de 0,5 - 1 hora de contacto raiz-fungo, a produção de  $O_2^{\bullet-}$  restringiu-se a zonas específicas da raiz, estando confinada às células epidérmicas. Ao fim de 2 - 3 horas após a inoculação, não foi observada acumulação de formazano, indicativo da produção de anião superóxido. O segundo pico, de maior intensidade traduzida pelo aumento da intensidade da coloração azul, foi observado 5 - 7 horas após a inoculação.



**Figura 5.10** Detecção *in situ* do anião superóxido, pelo método da redução de NBT, em raízes de *Castanea sativa* inoculadas com o fungo *Pisolithus tinctorius*, após as primeiras horas de contacto (0,5 – 7 horas). A produção do anião superóxido é evidenciada pela acumulação de precipitados de formazano (coloração azul). Raízes não inoculadas foram utilizadas como controlo (ampliação 100x).

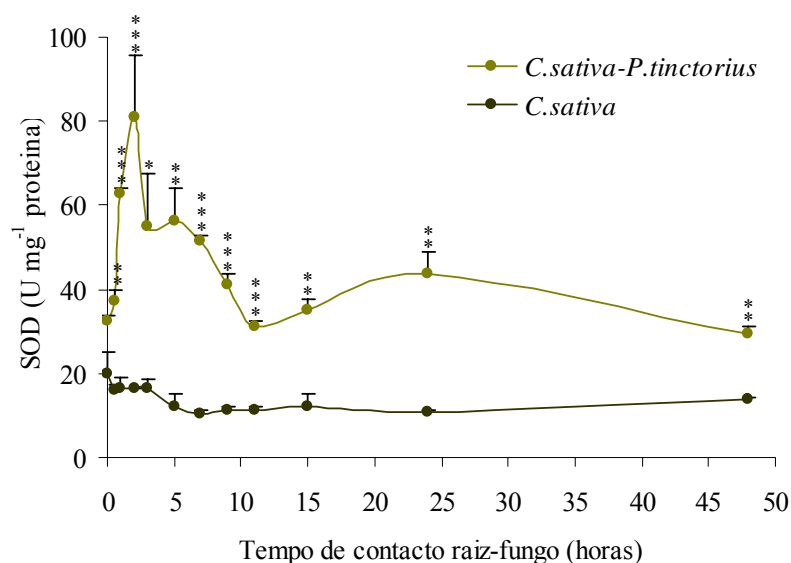
Contrariamente ao observado para o primeiro pico, a produção de  $O_2^{\bullet -}$  parece ocorrer intracelularmente. As raízes não inoculadas nunca apresentaram coloração azul, indicativo da produção de anião superóxido, para qualquer dos tempos de contacto raiz-fungo estudados.

### 5.2.1.3 Actividade de enzimas de stresse oxidativo

Em raízes de castanheiro inoculadas com *P. tinctorius* foi determinada a actividade de enzimas antioxidantes, designadamente superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Os ensaios foram efectuados no decurso das horas iniciais de contacto raiz-fungo (0 – 48h). Como controlo, foram utilizadas raízes de castanheiro não eliciadas.

#### *Superóxido dismutase (SOD)*

A determinação de actividade de SOD em raízes de castanheiro inoculadas com *P. tinctorius* demonstrou que para todos os tempos de inoculação estudados (0 - 48h), com excepção das 0 horas, as raízes inoculadas apresentavam actividades significativamente superiores às raízes não inoculadas (Figura 5.11). Verificou-se ainda que a actividade da SOD apresentou variações ao longo do tempo de inoculação, tendo-se registado três picos de actividade (Figura 5.11, Tabela 5.4). O primeiro pico, observado ao fim de 2 horas de inoculação, corresponde ao valor máximo da actividade registado ( $81,0 \text{ U mg}^{-1}$  proteína), sendo significativamente superior em 2,2 vezes ao valor obtido para raízes inoculadas ao fim de meia hora. Após decréscimo até às 3 horas de inoculação, registou-se um ligeiro aumento da actividade da SOD às 5 horas de contacto raiz-fungo, com um acréscimo significativo de 4,6 vezes relativamente às raízes não inoculadas. O valor correspondente a este aumento não foi, contudo, estatisticamente diferente do registado nas raízes inoculadas ao fim de 3 horas. A actividade da SOD decresce novamente até às 48 horas de inoculação exibindo apenas um ligeiro aumento ao fim de 24 horas de inoculação, significativo em 4,1 vezes face às raízes não inoculadas. Também para este tempo de contacto raiz-fungo não foram detectadas diferenças significativas, nos valores de actividade da SOD, face aos registados em raízes inoculadas ao fim de 11 horas.



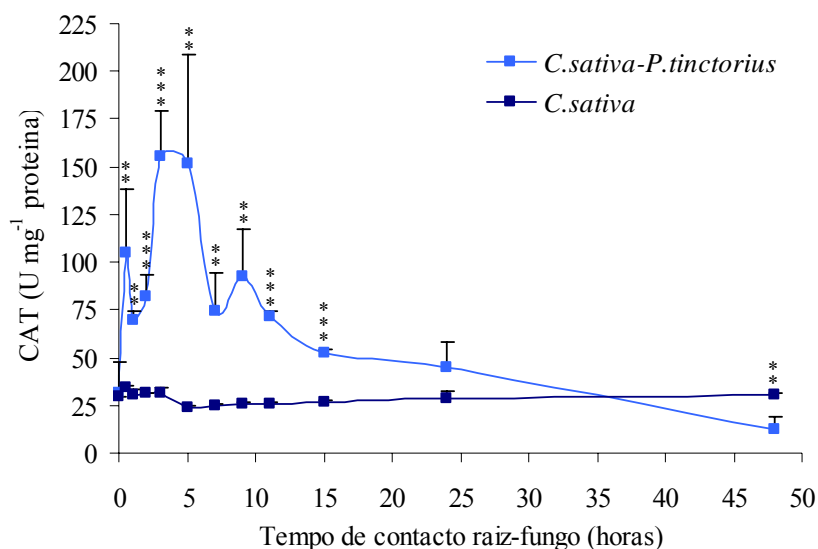
**Figura 5.11** Actividade da SOD em raízes de *Castanea sativa* após terem sido inoculadas com *Pisolithus tinctorius* (*C. sativa* - *P. tinctorius*). Raízes de plântulas não inoculadas foram utilizadas como controlo (*C. sativa*). A barra indica média  $\pm$  ep (n=3). As diferenças estatisticamente significativas entre plântulas inoculadas e não inoculadas, para o mesmo tempo de inoculação, são indicados por \* para  $p < 0,05$ ; \*\* para  $p < 0,01$ ; \*\*\* para  $p < 0,001$ .

**Tabela 5.4** Actividade da SOD em raízes de *Castanea sativa* inoculadas com *Pisolithus tinctorius*, determinada no decurso das primeiras 48 horas de contacto. Os valores de actividade da SOD são apresentados na forma média  $\pm$  desvio padrão (n=3). Valores com a mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de  $p < 0,05$ .

Tempo (h)	Actividade da SOD (U mg <sup>-1</sup> proteína)	Significância
0	32,4 $\pm$ 2,5	bc
0,5	37,3 $\pm$ 4,0	bc
1	62,6 $\pm$ 2,2	ab
2	81,0 $\pm$ 25,7	a
3	54,8 $\pm$ 21,7	abc
5	56,4 $\pm$ 13,3	abc
7	51,4 $\pm$ 2,2	abc
9	41,3 $\pm$ 4,3	bc
11	31,3 $\pm$ 1,7	bc
15	34,9 $\pm$ 4,5	bc
24	43,8 $\pm$ 9,1	bc
48	29,6 $\pm$ 2,4	c

### Catalase

Os resultados obtidos para a actividade da CAT permitem constatar que para todos os tempos de contacto raiz-fungo estudados (0 – 48h), com excepção das 0 e 24 horas, as raízes inoculadas apresentavam valores significativamente diferentes face às raízes não inoculadas (Figura 5.12). A actividade da enzima apresentou variações ao longo do tempo de contacto, tendo-se registado três picos de indução (Figura 5.12, Tabela 5.5). O primeiro pico foi detectado 0,5 horas após a inoculação, e corresponde a um aumento significativo de actividade de 3,0 e 3,4 vezes superior ao observado em raízes não inoculadas e em raízes eliciadas, 0 horas após a inoculação, respectivamente. Após um ligeiro decréscimo, observado ao fim de 1 hora de inoculação, a actividade da CAT aumenta, atingindo o valor mais elevado registado (155,3 U mg<sup>-1</sup> proteína), ao fim de 3-5 horas de inoculação. Este valor foi significativamente superior em 5,0 e 1,9 vezes face às raízes não inoculadas e inoculadas ao fim de 2 horas, respectivamente. Seguidamente a actividade da CAT decresce, exibindo apenas um ligeiro aumento (3,6 vezes face às raízes não inoculadas) ao fim de 9 horas de inoculação, o qual não é significativamente diferente do obtido para plântulas inoculadas ao fim de 7 horas. Ao fim de 48 horas de interacção raiz-fungo, são atingidos valores significativamente inferiores (2,5 vezes) em relação às raízes não inoculadas.



**Figura 5.12** Actividade da CAT em raízes de *Castanea sativa* após terem sido inoculadas com *Pisolithus tinctorius* (*C. sativa* - *P. tinctorius*). Raízes de plântulas não inoculadas foram utilizadas como controlo (*C. sativa*). A barra indica média  $\pm$  ep (n=3). As diferenças estatisticamente significativas entre plântulas inoculadas e não inoculadas, para o mesmo tempo de inoculação, são indicados por \*\* para  $p < 0,01$ ; \*\*\* para  $p < 0,001$ .

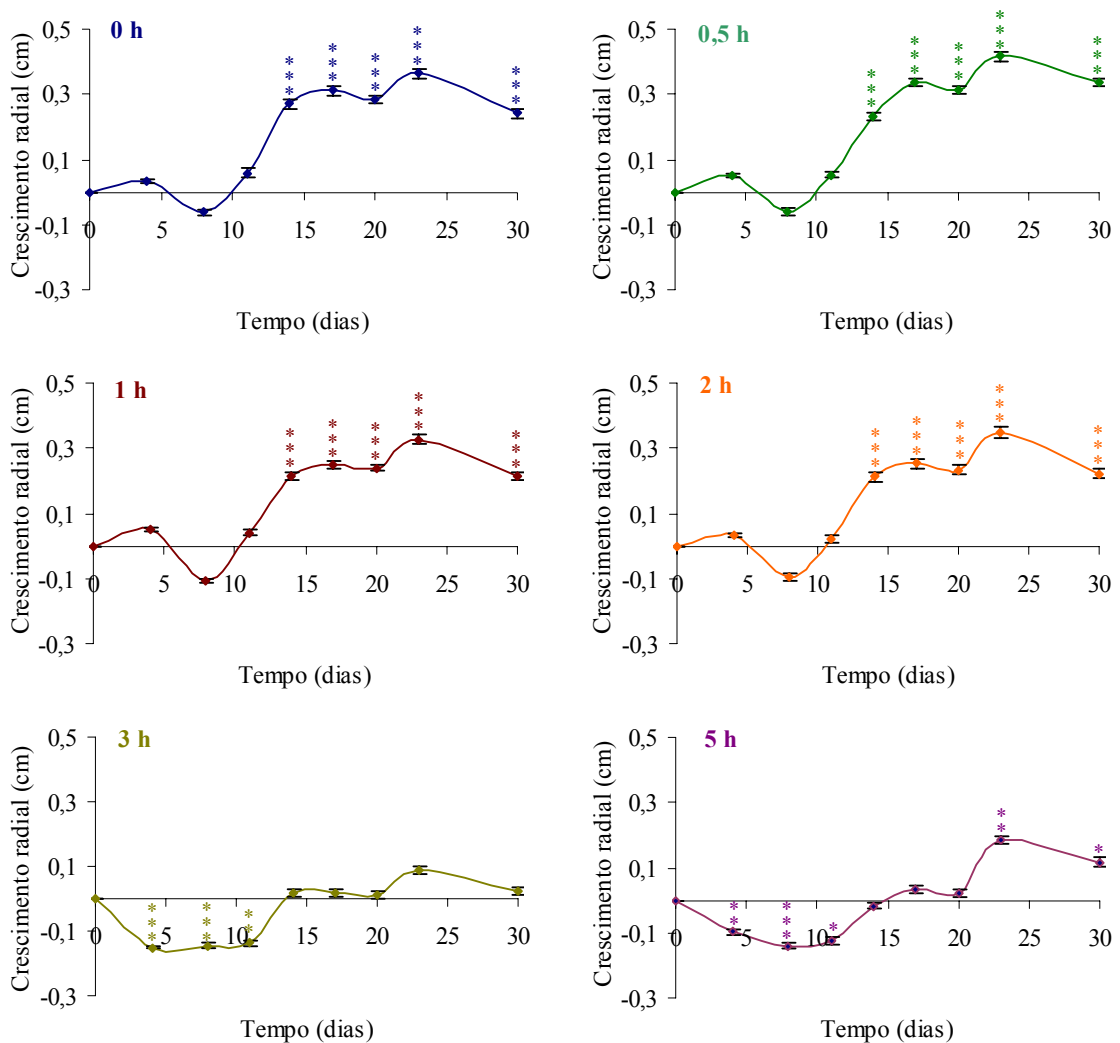
**Tabela 5.5** Actividade da CAT em raízes de *Castanea sativa* inoculadas com *Pisolithus tinctorius* determinada no decurso das primeiras 48 horas de contacto. Os valores de actividade da CAT são apresentados na forma média  $\pm$  desvio padrão (n=3). Valores com a mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de  $p < 0,05$ .

Tempo (h)	Actividade da CAT (U mg <sup>-1</sup> proteína)	Significância
0	31,3 $\pm$ 29,2	de
0,5	104,9 $\pm$ 58,0	abc
1	69,2 $\pm$ 8,8	cde
2	81,8 $\pm$ 19,2	bcde
3	155,3 $\pm$ 40,9	a
5	151,8 $\pm$ 99,3	ab
7	74,0 $\pm$ 35,3	cde
9	92,5 $\pm$ 42,6	abcd
11	71,0 $\pm$ 5,8	cde
15	52,8 $\pm$ 2,7	cde
24	44,8 $\pm$ 22,6	cde
48	12,2 $\pm$ 11,1	e

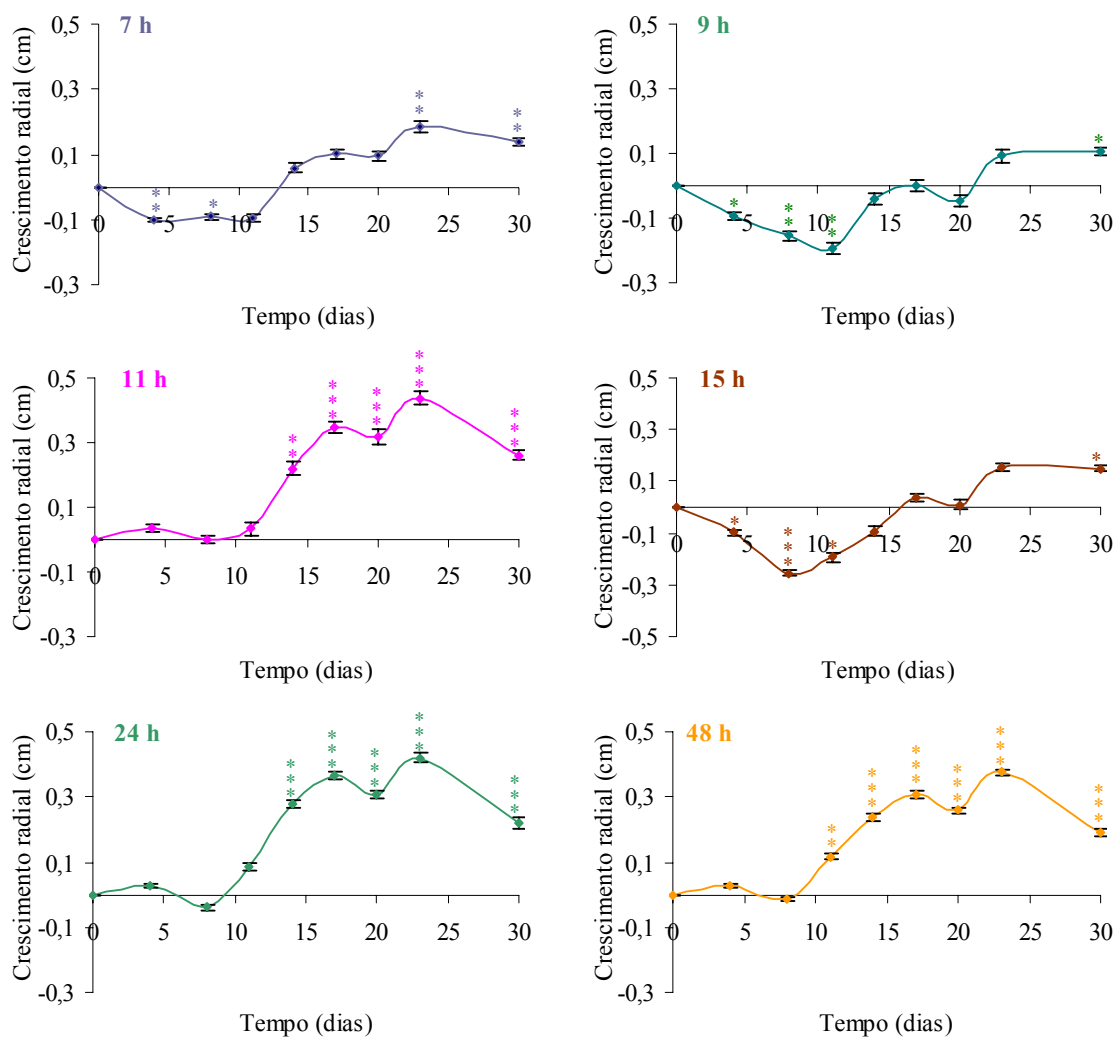
#### 5.2.1.4 Efeito do extracto proteico de raízes de castanheiro eliciadas com *P. tinctorius* no crescimento do fungo *P. tinctorius*

O efeito de extractos de raízes de castanheiro eliciadas por *P. tinctorius*, no crescimento deste fungo, foi avaliado para as primeiras 48 horas de interacção raiz-fungo. Plântulas de castanheiro eliciadas com *P. tinctorius* foram recolhidas a diferentes tempos de contacto raiz-fungo (0 – 48h), e utilizadas para a obtenção de extractos proteicos. A avaliação do crescimento de *P. tinctorius* decorreu em meio MMN gelificado, complementado com 24  $\mu$ g da proteína extraída. Após inoculação com *P. tinctorius*, o crescimento deste fungo foi avaliado nos 30 dias seguintes (Figura 5.13). Até aos 11 dias de inoculação, o crescimento de *P. tinctorius* nos meios de cultura contendo extractos proteicos preparados até às 2 horas de contacto raiz – fungo é muito semelhante ao observado nos controlos (meio MMN complementado com tampão de extracção). Nestes ensaios, a partir dos 14 dias de inoculação verifica-se o aumento significativo do crescimento radial das colónias de *P. tinctorius* face ao controlo. Esta

situação é igualmente observada para os casos em que foram utilizados extractos radiculares obtidos às 11 horas e após 24 horas de eliciação com *P. tinctorius*. Nos casos em que foram utilizados extractos proteicos de raízes eliciadas, obtidos entre as 3 e as 9 horas e também às 15 horas de contacto raiz-fungo, verificou-se uma diminuição significativa inicial do crescimento radial das colónias face ao controlo. Após 8 a 14 dias de inoculação do fungo, a taxa de crescimento de *P. tinctorius* atingiu valores semelhantes aos verificados nas placas controlo, registando-se em alguns casos aumentos significativos de crescimento relativamente ao controlo 23 ou 30 dias após inoculação.

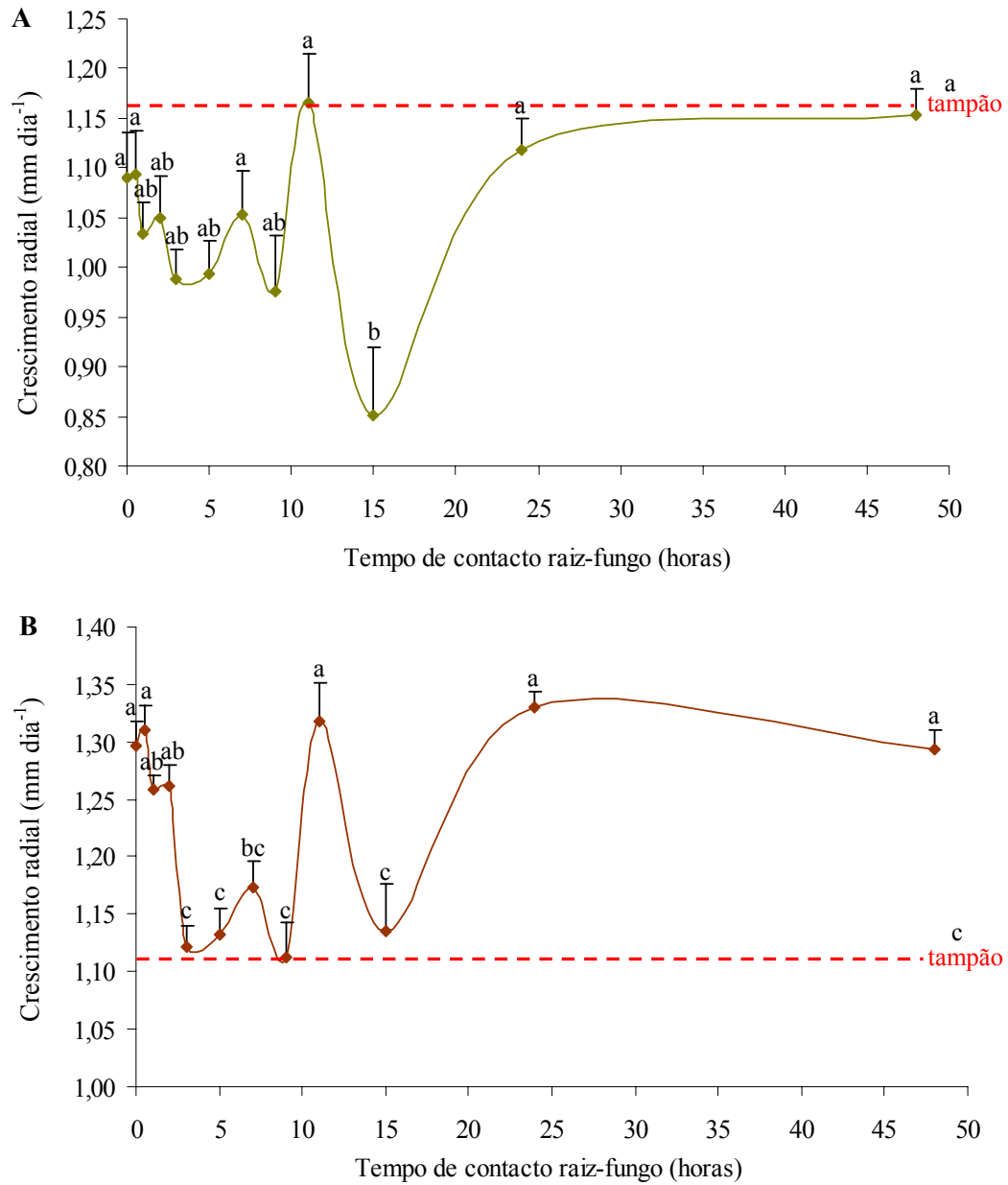


**Figura 5.13** Crescimento radial relativo (diferença entre o crescimento radial de colónias de *Pisolithus tinctorius* a crescer em meio MMN, na presença de extracto proteico de raízes de *Castanea sativa* eliciadas e colónias de *P. tinctorius* a crescer em meio MMN na presença de tampão de extracção). Neste ensaio foram utilizados extractos proteicos de raízes eliciadas, após diferentes tempos de contacto raiz-fungo (0-48 h), e indicado no respectivo gráfico. A barra indica média  $\pm$  ep (n=5). A existência de diferenças estatísticas relativamente ao controlo, para o mesmo tempo de inoculação, é indicada por \* para  $p < 0,05$ ; \*\* para  $p < 0,01$ ; \*\*\* para  $p < 0,001$ .



**Figura 5.13** Continuação.

O efeito de extractos proteicos de raízes sujeitas a diferentes tempos de contacto com o fungo, no crescimento radial de colónias de *P. tinctorius*, foi comparado ao fim de 8 e de 17 dias de crescimento do micélio na presença do extracto. Os resultados encontram-se apresentados na figura 5.14 e indicam que ao fim de 8 dias de cultura do fungo na presença de extractos de raízes em contacto com o fungo até 48 horas, o crescimento das colónia foi inferior ao observado nas colónias crescidas na presença de tampão de extracção (controlo) (Figura 5.14A) à excepção de quando foi utilizado extracto proteico de raízes após 11 horas de contacto com o fungo. Contudo, apenas as colónias de *P. tinctorius* crescidas em extractos radiculares obtidos após 15 horas de contacto raiz-fungo apresentaram uma redução significativa de crescimento da observada no controlo.

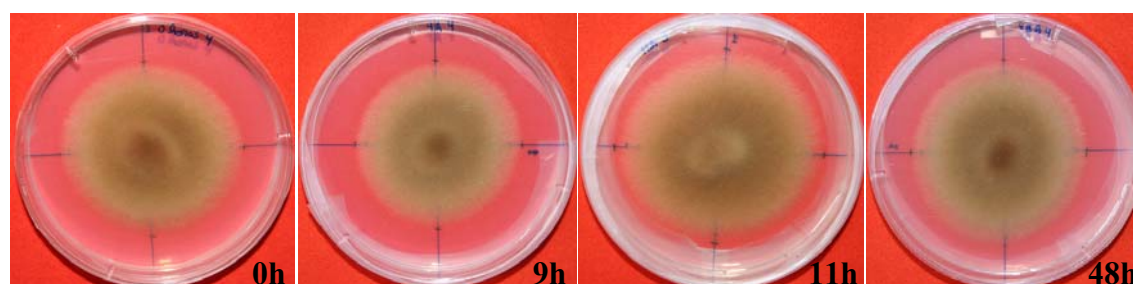


**Figura 5.14** Crescimento radial de *Pisolithus tinctorius*, determinado ao fim de 8 (A) e 17 (B) dias de incubação em meio MMN complementado com extractos proteicos radiculares de plântulas de *Castanea sativa* eliciadas com *P. tinctorius* (0-48 horas). Como controlo foi utilizado meio MMN contendo tampão de extracção (linha a tracejado). A barra indica média  $\pm$  ep (n=5). Valores com a mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de  $p < 0,05$ .

Ao fim de 17 dias de inoculação, o crescimento radial das colónias de *P. tinctorius* incubadas com extractos radiculares de raízes sujeitas a diferentes tempos de contacto com o fungo (0-48h) foi sempre superior ou igual ao registado nas placas controlo (Figura 5.14B). Os resultados indicam ainda que o aumento do crescimento radial de

*P. tinctorius* foi variável em função do tempo de contacto raiz-fungo do extracto radicular utilizado. O extracto de raiz de *C. sativa* não eliciada (0 horas) promoveu significativamente o crescimento radial de *P. tinctorius*, comparativamente ao crescimento do fungo na presença de tampão de extracção (controlo). De igual modo, os extractos proteicos de raízes eliciadas sujeitas a 2, 11 e após 24 horas de contacto com o fungo, estimularam o crescimento do *P. tinctorius*, observando-se valores significativamente superiores ( $> 0,2 \times$ ) aos observados nas placas controlo. Quando foram utilizados extractos proteicos obtidos de raízes eliciadas, no intervalo 3 a 9 horas de contacto com o fungo e ao fim de 15 horas de contacto, verificou-se uma diminuição do estímulo verificado no crescimento do fungo, observando-se valores muito semelhantes aos determinados nas placas controlo. Adicionalmente, apesar de não se registarem diferenças estatísticas, verificou-se que os extractos proteicos de raízes após 7 horas de contacto com o fungo induziam ligeiramente o crescimento de *P. tinctorius*.

A análise macroscópica das colónias de *P. tinctorius* crescidas na presença de extractos proteicos de raízes sujeitas a diferentes tempos de contacto com o fungo *P. tinctorius*, não evidenciou diferenças ao nível morfológico (Figura 5.15). Todas as colónias de *P. tinctorius* apresentavam o micélio muito denso e com crescimento aéreo, sobretudo na parte central das colónias. A sua coloração era acastanhada, apresentando-se mais escura no centro. As margens apresentavam-se regulares, não tendo sido observada a formação de exsudados, traduzida pela presença de gotículas.



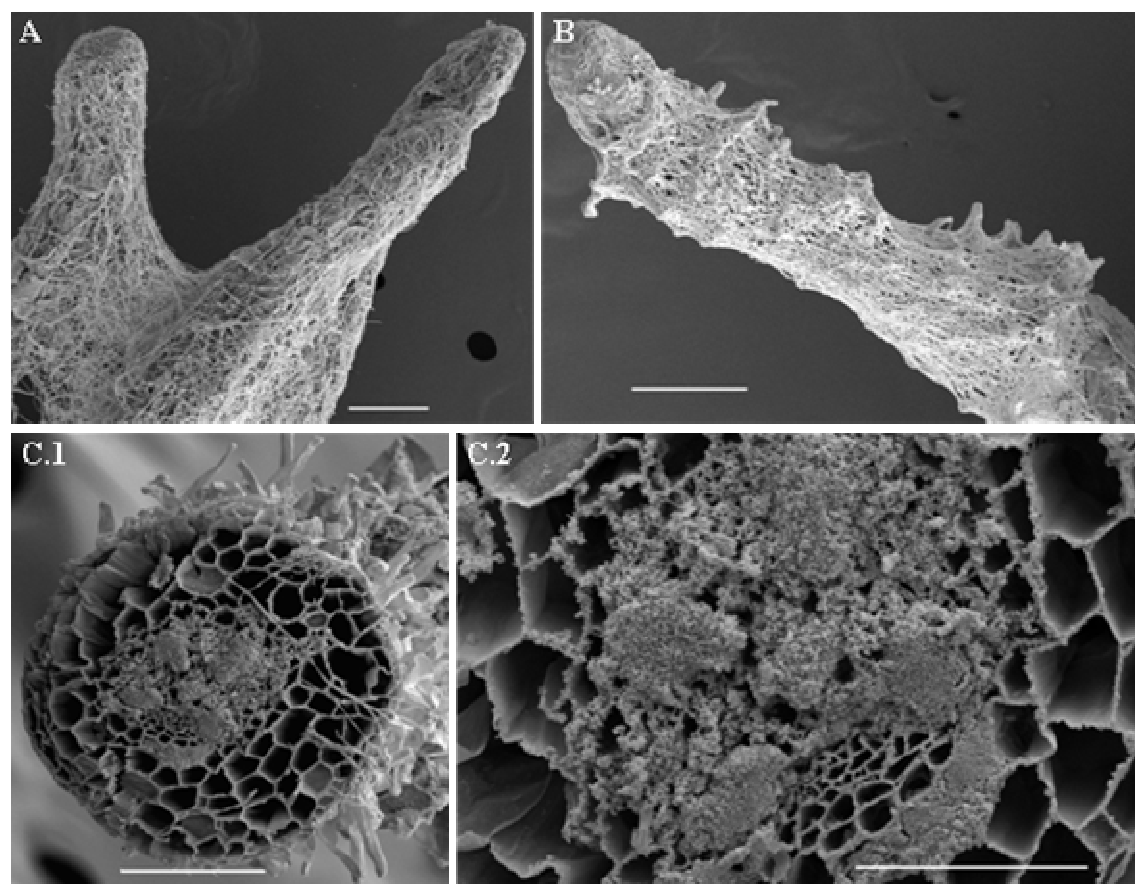
**Figura 5.15** Aspecto macroscópico das colónias de *Pisolithus tinctorius*, 23 dias após inoculação, em meio de cultura MMN contendo extractos proteicos radiculares de plântulas de *Castanea sativa*. Cada placa corresponde ao ensaio de um extracto proteico de raízes de castanheiro eliciadas, sendo indicado o período de tempo de interacção com *P. tinctorius* a que se refere.

### 5.2.2 Interação *Castanea sativa* – *Hypholoma fasciculare*

A resposta das plântulas de castanheiro ao fungo saprófita *H. fasciculare* foi estudada durante as primeiras 48 horas de contacto raiz-fungo. Foram avaliadas a capacidade de adesão do fungo à raiz e o envolvimento de hidrofobinas neste processo, a produção de ROS, nomeadamente de peróxido de hidrogénio e de anião superóxido, e a determinação da actividade de enzimas de stresse oxidativo, como a superóxido dismutase e catalase. Os ensaios foram efectuados em raízes de castanheiro eliciadas com micélio de *H. fasciculare* e não eliciadas (controlo) para os mesmos tempos de interacção raiz-fungo. Foram ainda avaliadas alterações estruturais nas raízes do castanheiro decorrentes da inoculação com *H. fasciculare*, ao longo de 60 dias de interacção raiz-fungo, assim como o aparecimento de sintomas indicadores de situações de stresse/doença.

#### 5.2.2.1 Capacidade de adesão de *H. fasciculare* a raízes de castanheiro

A capacidade de adesão de *H. fasciculare* às raízes de plântulas de castanheiro e a avaliação de alterações estruturais nas raízes foi efectuada por microscopia electrónica de varrimento. Foram observadas raízes sujeitas a diferentes tempos de contacto com o fungo, até a um máximo de 60 dias. Após 48 horas de interacção raiz-fungo, é já notória a adsorção de hifas à superfície radicular (Figura 5.16A). No decurso do contacto raiz-fungo a densidade de hifas depositadas à superfície das raízes aumenta significativamente sendo possível observar, ao fim de 25 dias, uma espessa e compacta camada de hifas a envolver toda a superfície radicular (Figura 5.16B). A observação de secções transversais das raízes evidencia que, ao fim de 60 dias de interacção raiz-fungo, os vasos condutores, especialmente o xilema, encontravam-se obstruídos (Figura 5.16C.1, C.2). Não foi possível observar a ocorrência de penetração das hifas nos tecidos radiculares. Em plântulas crescidas em idênticas condições, mas não sujeitas ao contacto com o fungo, não se observou oclusão dos vasos condutores (resultados não apresentados).



**Figura 5.16** Raízes de *Castanea sativa* após 48 horas (A) e 25 dias (B) de contacto com *Hypholoma fasciculare*, em microscopia electrónica de varrimento. Cortes transversais de raízes inoculadas ao fim de 60 dias (C.1, C.2) com *H. fasciculare* apresentam obstrução dos vasos condutores. Barra 100 $\mu$ m (A, B, C.1); 50 $\mu$ m (C.2).

### 5.2.2.2 Sintomas em plântulas de *C. sativa* decorrentes da eliciação radicular com *H. fasciculare*

As plântulas de castanheiro sujeitas ao contacto com *H. fasciculare* ao nível radicular manifestaram sintomas indicadores de uma situação de stress ou doença ao fim de 60 dias de contacto raiz-fungo. As folhas, perderam a sua coloração verde brilhante normal, apresentando uma clorose que se foi acentuando até caírem prematuramente. Este amarelecimento das folhas parece ter tido início a partir dos feixes vasculares, expandindo-se progressivamente por todo o limbo (Figura 5.17). As raízes apresentaram-se enegrecidas, com a epiderme mole e em vias de decomposição (resultados não mostrados). Nas plântulas controlo (não inoculadas com *H. fasciculare*), nas quais foi promovido o crescimento exactamente nas mesmas condições que nas plântulas inoculadas, as folhas apresentaram-se verdes e brilhantes para os mesmos tempos de estudo.



**Figura 5.17** Aspecto de folhas de plântulas de *Castanea sativa* não eliciadas (A) e após 60 dias de contacto raiz- *Hypholoma fasciculare* (B).

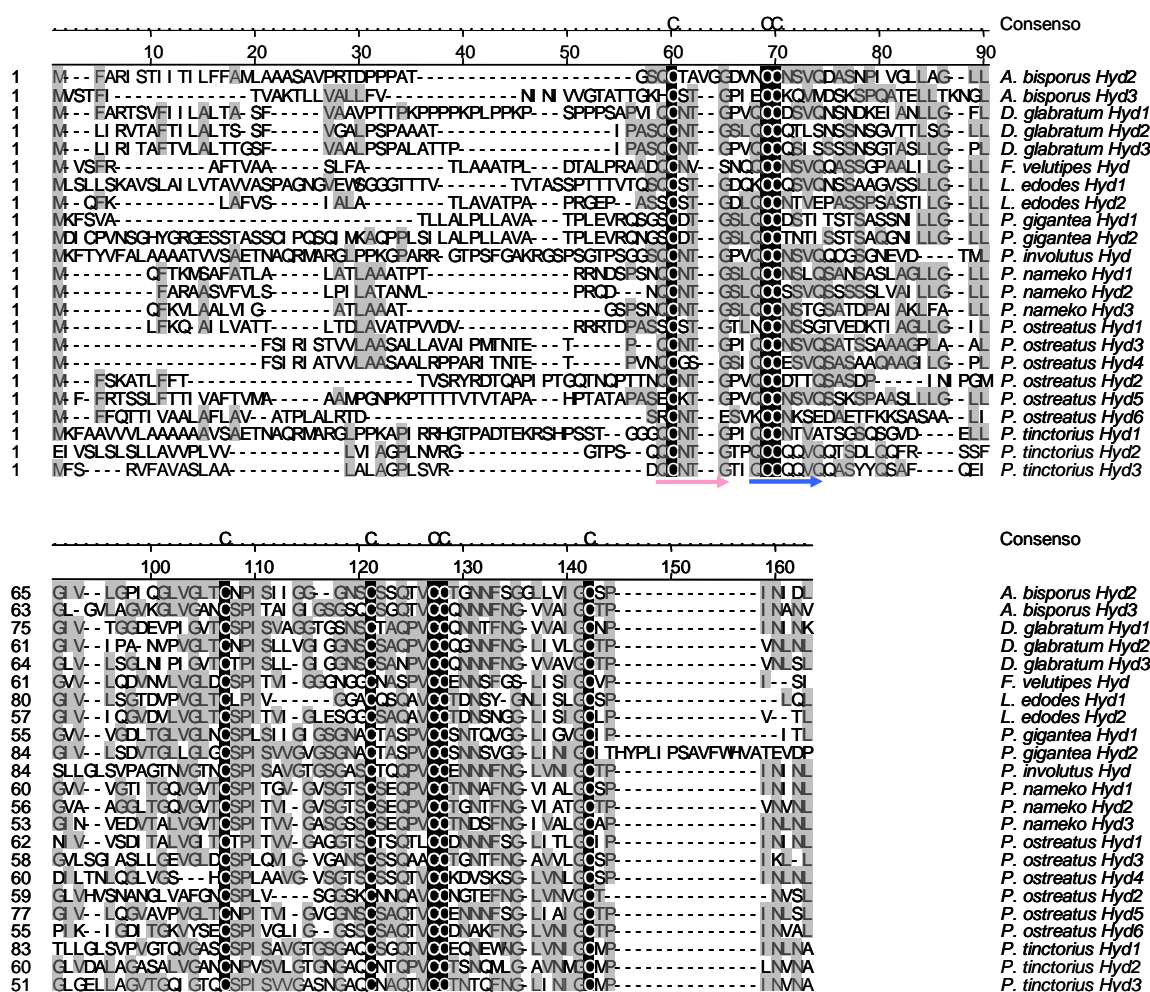
### 5.2.2.3 Envolvimento de hidrofobinas na adesão de *H. fasciculare* a raízes de *C. sativa*

Com o objectivo de avaliar o envolvimento de hidrofobinas na adesão do fungo saprófita *H. fasciculare* às raízes de castanheiro foi iniciado o estudo da expressão de genes que codificam hidrofobinas de *H. fasciculare* no decurso do contacto raiz-fungo. Este estudo foi iniciado pela amplificação termocíclica de uma sequência nucleotídica homóloga às de genes codificantes de hidrofobinas de fungos, dado não ter sido editada na base NCBI sequências de DNA de *H. fasciculare* que codifiquem aquelas proteínas.

#### *Desenho dos iniciadores oligonucleotídicos*

A metodologia utilizada na concepção dos iniciadores oligonucleotídicos degenerados, a utilizar na amplificação termocíclica de regiões codificantes de hidrofobinas de *H. fasciculare*, baseou-se na análise comparativa de sequências aminoacídicas de hidrofobinas de diferentes espécies pertencentes à classe dos basidiomicetos, editadas na base de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A análise do alinhamento destas sequências aminoacídicas, efectuada recorrendo ao programa *MegAlign* (DNASTAR), utilizando o método Clustal, permitiu identificar as regiões mais conservadas das hidrofobinas, as quais incluem as oito cisteínas conservadas, características destas proteínas (Figura 5.18). Estas regiões conservadas foram consideradas para a concepção de iniciadores oligonucleotídicos degenerados,

atendendo-se ao grau de degenerescência do iniciador concebido. Foram preferencialmente consideradas regiões pobres em leucina, arginina e serina que por serem aminoácidos muito degenerados contribuem significativamente para o aumento da degenerescência final dos iniciadores.



**Figura 5.18** Alinhamento de seqüências aminoácídicas de hidrofobinas fúngicas editadas na base de dados NCBI. As seqüências aminoácídicas foram alinhadas com o programa *MegAlign* (DNASTAR) utilizando o método Clustal. Os resíduos aminoácídicos estão sombreadas a cinzento e as cisteínas conservadas em todas as seqüências de hidrofobinas, estão sombreadas a preto. As regiões utilizadas na concepção do iniciador oligonucleotídico na orientação directa *HydHfFO1* (seta rosa) e *HydHfFO2* (seta azul) bem como do iniciador oligonucleotídico na orientação inversa *HydHfRE* (seta verde) encontram-se assinaladas (ver anexo III para os números de acesso).

Neste trabalho foram utilizados dois iniciadores oligonucleotídicos na orientação directa (*HydHfFO1* e *HydHfFO2*) e um iniciado oligonucleotídico na orientação inversa (*HydHfRE*), encontrando-se as respectivas seqüências apresentadas na tabela 5.6. Com

base nas sequências editadas em base de dados, exibidas na figura 5.18, o par de iniciadores *HydHfFO1/HydHfRE* permitirá a amplificação de um fragmento com cerca de 213 pb, enquanto que amplificação realizada na presença do par de iniciadores *HydHfFO2/HydHfRE* originará um fragmento de cerca de 186 pb.

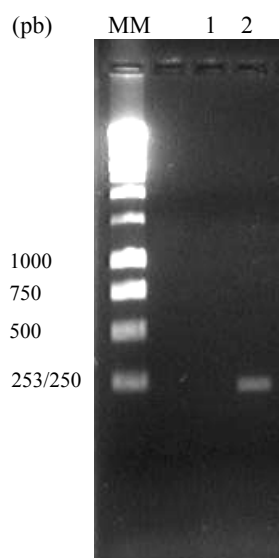
**Tabela 5.6** Iniciadores oligonucleotídicos degenerados concebidos para a amplificação termocíclica de regiões codificantes de hidrofobinas de *Hypholoma fasciculare*.

Designação	Sequência nucleotídica (5'→3')	Grau de degenerescência	Orientação do iniciador	
<i>HydHfFO1</i>	CAR TGY AAY ACI GGI TC	8×	directa	
<i>HydHfFO2</i>	CAR TGY TGY MAI AGY GTI CA	32×	directa	
<i>HydHfRE</i>	KRC ARC AIA CIG KYT G	32×	inversa	
I: desoxinosina	R: A+G	M: A+C	Y: C+T	K: T+G

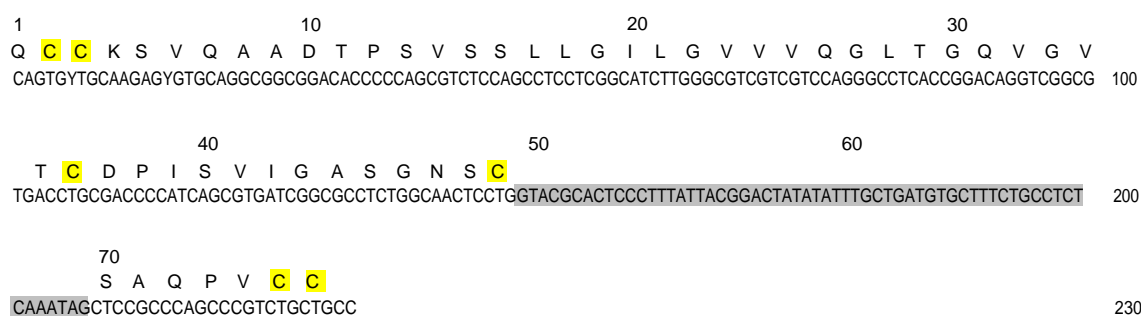
A amplificação termocíclica foi efectuada a partir de DNA de *H. fasciculare*, extraído de micélio, que apresentava um elevado grau de pureza ( $A_{260}/A_{280}=1,91$ ). Para ambos os pares de iniciadores concebidos, nas respectivas reacções, foi considerada a mesma temperatura de hibridação de 50°C. A análise electroforética dos produtos de reacção (Figura 5.19) evidenciou ausência de amplificação quando foram utilizando os iniciadores *HydHfFO1/HydHfRE* e a amplificação de um fragmento de cerca de 250 pb, quando foram utilizados os iniciadores *HydHfFO2/HydHfRE*. Apesar do fragmento amplificado apresentar uma dimensão ligeiramente superior da esperada (186 pb), procedeu-se à sua sequenciação e caracterização.

#### **Análise da sequência de hidrofobina de *H. fasciculare***

A sequência nucleotídica (*HydHf*) putativamente codificante de uma hidrofobina de *H. fasciculare* bem como a respectiva sequência aminoacídica deduzida encontram-se apresentadas na figura 5.20. A sequência nucleotídica compreende 230 pb e inclui uma sequência não traduzida (intrão) de 61 pb e uma grelha de leitura aberta (ORF) de 169 pb. Apesar de não conter toda a região codificante, o fragmento codifica 56



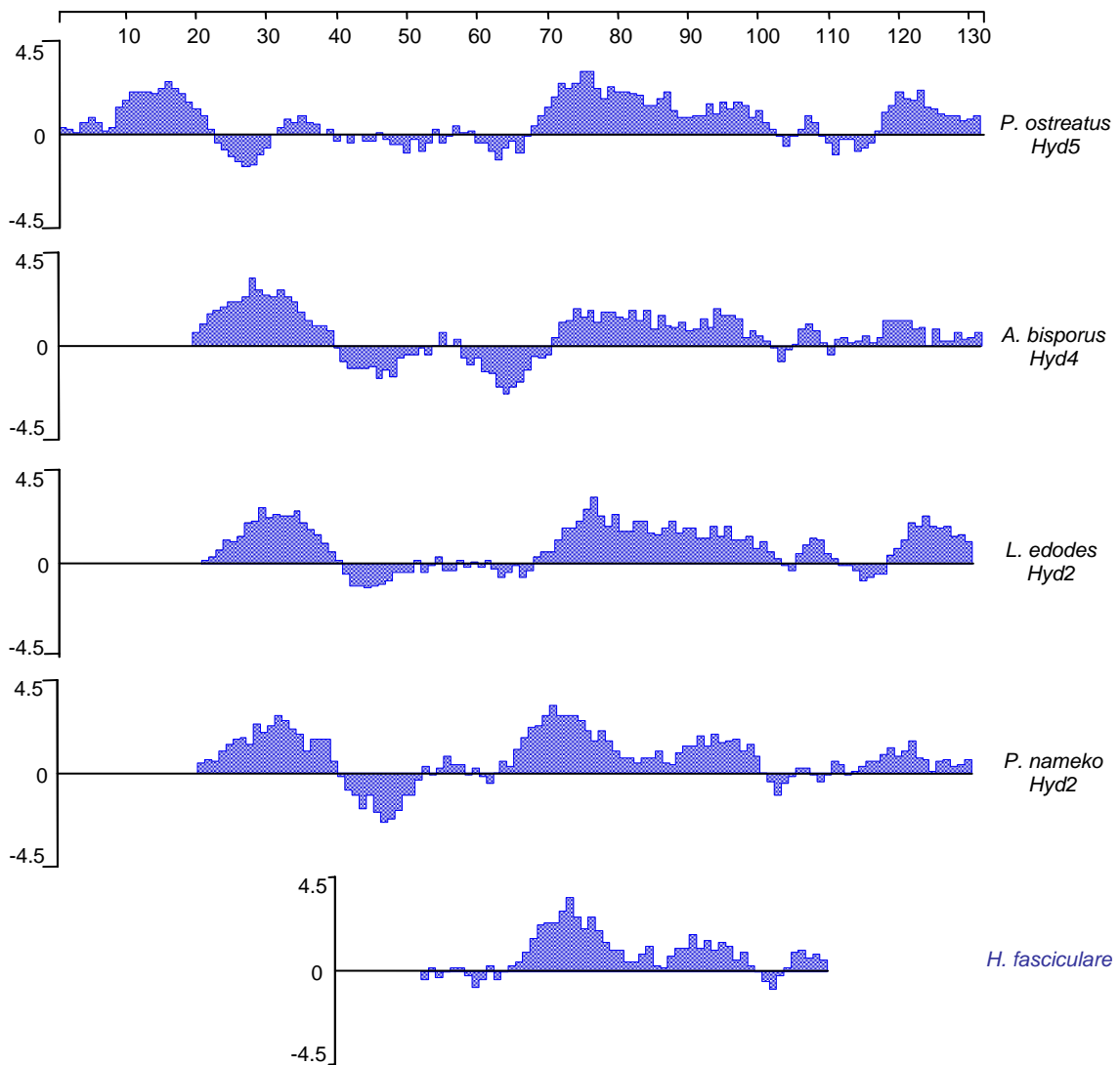
**Figura 5.19** Análise electroforética dos produtos resultantes da amplificação de DNA de *Hypholoma fasciculare*, na presença dos iniciadores *HydHfFO1/HydHfRE* (1) e *HydHfFO2/HydHfRE* (2). A electroforese foi realizada em gel de agarose 2,0% (p/v). MM - marcador de massa molecular (*1kb DNA Ladder*).



**Figura 5.20** Sequências nucleotídica e aminoácídica deduzida do fragmento de *HydHf* de *Hypholoma fasciculare*. A sequência aminoácídica deduzida é apresentada no código de uma letra. Os números à direita referem-se aos nucleótidos e os números por cima referem-se aos aminoácidos. A sequência nucleotídica sombreada a cinzento representa a sequência não traduzida (intrão). Os resíduos de cisteína conservados em todas as hidrofobinas estão evidenciados a amarelo.

resíduos aminoácídicos, dos quais 20 são hidrofóbicos (alanina, isoleucina, leucina e valina). De facto, o perfil de hidrofobicidade, determinado de acordo com o algoritmo de Kyte e Doolittle (1982), da sequência aminoácídica deduzida de *HydHf* evidencia a presença de um domínio com características marcadamente hidrofóbicas (Figura 5.21). A presença de domínios hidrofóbicos é uma característica das hidrofobinas, sendo facilmente identificável a presença de três domínios hidrofóbicos conservados nos seus perfis de hidrofobicidade. A hidrofobina da espécie *Pholiota nameko* foi a que, de entre

as diferentes espécies fúngicas, apresentou um perfil de hidrofobicidade mais similar ao observado para a sequência deduzida do fragmento de *HydHf* de *H. fasciculare*.



**Figura 5.21** Perfil de hidrofobicidade de hidrofobinas de fungos pertencentes à classe basidiomicetos e sua comparação com o fragmento de *HydHf* de *Hypholoma fasciculare*. As sequências aminoacídicas foram analisadas utilizando o algoritmo de Kyte e Doolittle (Protean, DNASTAR) (ver anexo III para os números de acesso).

O alinhamento da sequência aminoacídica deduzida de *HydHf* de *H. fasciculare* com outras hidrofobinas de espécies fúngicas pertencentes à classe dos basidiomicetos evidenciou uma elevada homologia (Figura 5.22). A sequência de *HydHf* apresenta resíduos aminoacídicos conservados em todas as sequências de hidrofobinas analisadas,

nomeadamente, a cisteína, na posição 69, 70, 107, 121, 127 e 128, e a prolina, na posição 109. Outros resíduos aminoácídicos, designadamente a leucina (na posição 90), a glicina (na posição 91, 104 e 118), a isoleucina (na posição 110), a glutamina (na posição 68 e 124) e a valina (na posição 126) encontram-se igualmente muito conservados.

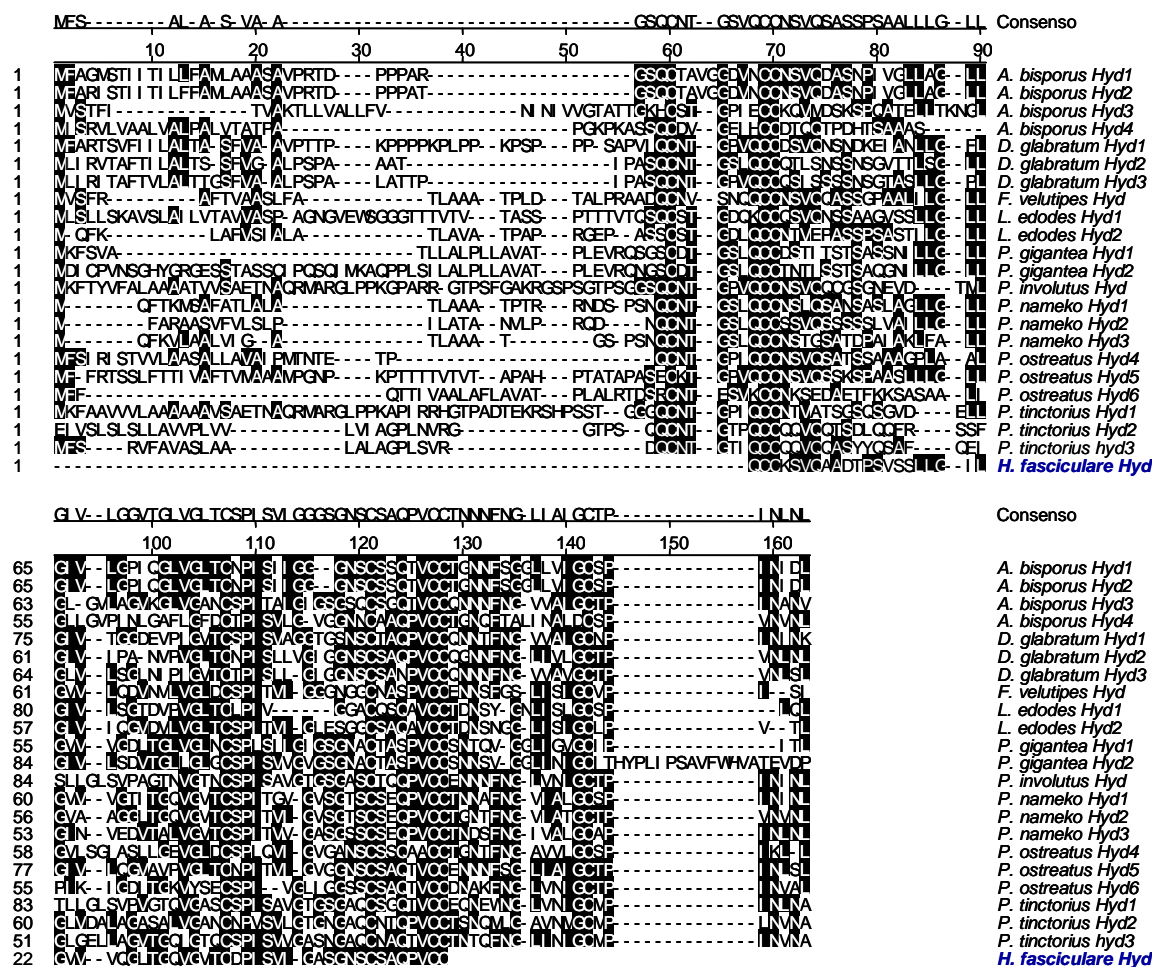


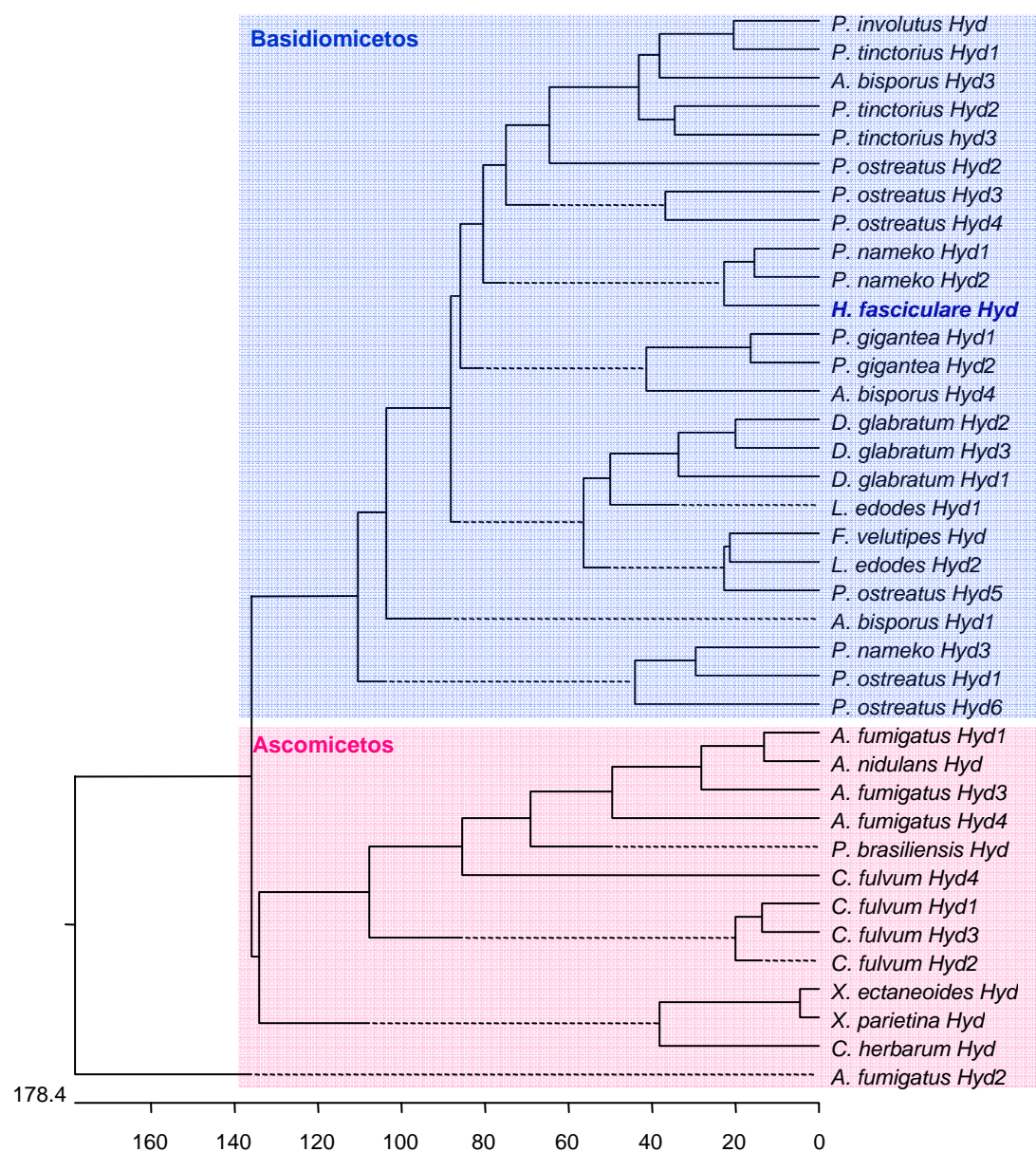
Figura 5.22 Alinhamento da sequência aminoácídica deduzida do fragmento de *HydHf* de *Hypholoma fasciculare* com as hidrofobinas de outros fungos pertencentes à classe dos basidiomicetos. As sequências aminoácídicas foram alinhadas com o programa *MegAlign* (DNASTAR) utilizando o método Clustal. Os resíduos conservados na maioria das sequências estão sombreados a preto (ver anexo III para os números de acesso).

A análise comparativa da sequência aminoácídica deduzida de *HydHf* com as regiões correspondentes de outras hidrofobinas de espécies fúngicas revelou igualmente elevadas percentagens de identidade, as quais apresentavam valores superiores para hidrofobinas de espécies da classe basidiomicetos (67,9 – 32,1%) do que para as da

**Tabela 5.7** Percentagem de identidade entre a sequência aminoacídica deduzida de *HydHf* de *Hypholoma fasciculare* e as regiões correspondentes de outras hidrofobinas de espécies fúngicas pertencentes às classes basidiomicetos e ascomicetos. A análise das sequências aminoacídicas foi efectuada pelo método Clustal (ver anexo III para os números de acesso).

<b>Hidrofobinas</b>	<b>% identidade</b>
<b>Basidiomicetos</b>	
<i>Pholiota nameko Hyd2</i>	67,9
<i>Pholiota nameko Hyd1</i>	64,3
<i>Pleurotus ostreatus Hyd5</i>	62,5
<i>Lentinula edodes Hyd2</i>	55,4
<i>Pholiota nameko Hyd3</i>	55,4
<i>Dictyonema glabratum Hyd3</i>	55,4
<i>Agaricus bisporus Hyd1</i>	51,8
<i>Agaricus bisporus Hyd2</i>	51,8
<i>Dictyonema glabratum Hyd1</i>	51,8
<i>Phlebiopsis gigantea Hyd1</i>	51,8
<i>Flammulina velutipes Hyd</i>	50,0
<i>Pleurotus ostreatus Hyd1</i>	46,4
<i>Pisolithus tinctorius Hyd3</i>	44,6
<i>Lentinula edodes Hyd1</i>	42,9
<i>Phlebiopsis gigantea Hyd2</i>	42,9
<i>Pleurotus ostreatus Hyd4</i>	42,9
<i>Pleurotus ostreatus Hyd3</i>	41,1
<i>Dictyonema glabratum Hyd2</i>	39,3
<i>Agaricus bisporus Hyd4</i>	37,5
<i>Agaricus bisporus Hyd3</i>	35,7
<i>Paxillus involutus Hyd</i>	35,7
<i>Pisolithus tinctorius Hyd1</i>	35,7
<i>Pleurotus ostreatus Hyd6</i>	32,1
<i>Pisolithus tinctorius Hyd2</i>	32,1
<b>Ascomicetos</b>	
<i>Cladosporium fulvum Hyd2</i>	23,2
<i>Xanthoria parietina Hyd</i>	21,4
<i>Xanthoria ectaneoides Hyd</i>	21,4
<i>Cladosporium fulvum Hyd3</i>	21,4
<i>Aspergillus fumigatus Hyd1</i>	19,6
<i>Aspergillus fumigatus Hyd2</i>	19,6
<i>Aspergillus fumigatus Hyd3</i>	19,6
<i>Aspergillus nidulans Hyd</i>	19,6
<i>Cladosporium fulvum Hyd1</i>	19,6
<i>Metarhizium anisopliae Hyd</i>	19,6
<i>Paracoccidioides brasiliensis Hyd</i>	19,6
<i>Aspergillus fumigatus Hyd4</i>	17,9
<i>Cladosporium herbarum Hyd</i>	16,1
<i>Cladosporium fulvum Hyd4</i>	16,1

classe ascomicetos ( $\leq 23,2\%$ ) (Tabela 5.7). De facto, a análise da árvore filogenética elaborada através do programa *MegAlign* (DNASTAR), utilizando o método Clustal e a tabela dos pesos residuais PAM250, permite constatar que as hidrofobinas de espécies pertencentes à classe ascomicetos e à classe basidiomicetos originam dois agrupamentos distintos, estando a sequência deduzida de *HydHf* incluída neste último agrupamento (Figura 5.23).



**Figura 5.23** Árvore filogenética representando a relação entre a *HydHf* de *Hypholoma fasciculare* e as regiões correspondentes de outras hidrofobinas de espécies pertencentes às classes basidiomicetos e ascomicetos. As sequências aminoácidas foram alinhadas utilizando o programa *MegAlign* (DNASTAR) pelo método de Clustal utilizando a tabela dos pesos residuais PAM250. O comprimento de cada par de ramos representa a distância entre cada par de sequências. A escala que se encontra sob a árvore mede a distância entre as sequências (ver anexo III para os números de acesso).

No agrupamento relativo aos basidiomicetos, verificou-se ainda que a maioria das hidrofobinas pertencentes à mesma ordem se encontravam filogeneticamente próximas (Figura 5.23). De entre as diferentes espécies destacam-se *Pisolithus tinctorius* e *Paxillus involutus*, ambas incluídas na ordem Boletales; e ainda as espécies *Pholiota nameko* e *Hypholoma fasciculare*, ambas pertencentes à ordem Agaricales e à família Strophariacea. De facto, as hidrofobinas da espécie *Pholiota nameko* foram as que apresentaram maior percentagem de identidade com a sequência aminoacídica deduzida de *HydHf* de *H. fasciculare*, com valores entre 67,9 e 55,4% (Tabela 5.7).

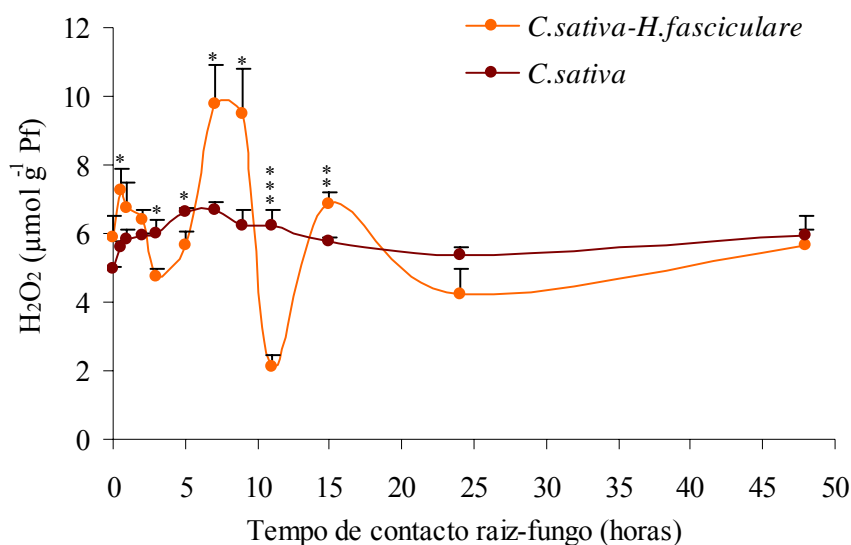
O envolvimento das hidrofobinas na capacidade de adesão das hifas de *H. fasciculare* a raízes de castanheiro está a ser avaliada por análise de expressão do gene *HydHf* nas primeiras horas de contacto raiz-fungo. Desse modo, foi otimizado o método para a extracção de RNA de raízes de *C. sativa* que foi aplicado à obtenção de RNA de raízes eliciadas a diferentes tempos, aguardando-se a respectiva análise de *Northern*.

#### 5.2.2.4 Produção de espécies reactivas de oxigénio

A produção de espécies reactivas de oxigénio em raízes de castanheiro inoculadas com *H. fasciculare* foi avaliada por determinação espectrofotométrica dos níveis de  $H_2O_2$  e pela detecção histoquímica de  $O_2^{\cdot-}$  pelo método de redução do NBT.

##### *Peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ )*

A avaliação da produção de  $H_2O_2$  em raízes de *C. sativa* nas primeiras horas de contacto (0 - 48h) com o fungo *H. fasciculare* foi efectuada considerando como controlo raízes de castanheiro não eliciadas para os mesmos tempos de interacção. Tal como previamente descrito para a interacção *C. sativa* – *P. tinctorius* foram observados três picos na produção de  $H_2O_2$  (Figura 5.24, Tabela 5.8). O primeiro aumento ocorreu ao fim de 30 minutos após a eliciação, apresentando um acréscimo significativo de 1,3 vezes relativamente às plântulas não eliciadas, mas não se verificando diferenças significativas face às plântulas imediatamente após eliciação (0 horas). Seguidamente, os níveis de  $H_2O_2$  decresceram, atingindo valores significativamente inferiores (1,2



**Figura 5.24** Quantificação de  $H_2O_2$  em raízes de *Castanea sativa* no decurso da eliciação com *Hypholoma fasciculare* (*C. sativa*-*H. fasciculare*). Raízes de plântulas não inoculadas foram utilizadas como controlo (*C. sativa*). A barra indica média  $\pm$  ep (n=3). As diferenças estatisticamente significativas entre plântulas inoculadas e não inoculadas, para o mesmo tempo de inoculação, são indicados por \* para  $p < 0,05$ ; \*\* para  $p < 0,01$ ; \*\*\* para  $p < 0,001$ .

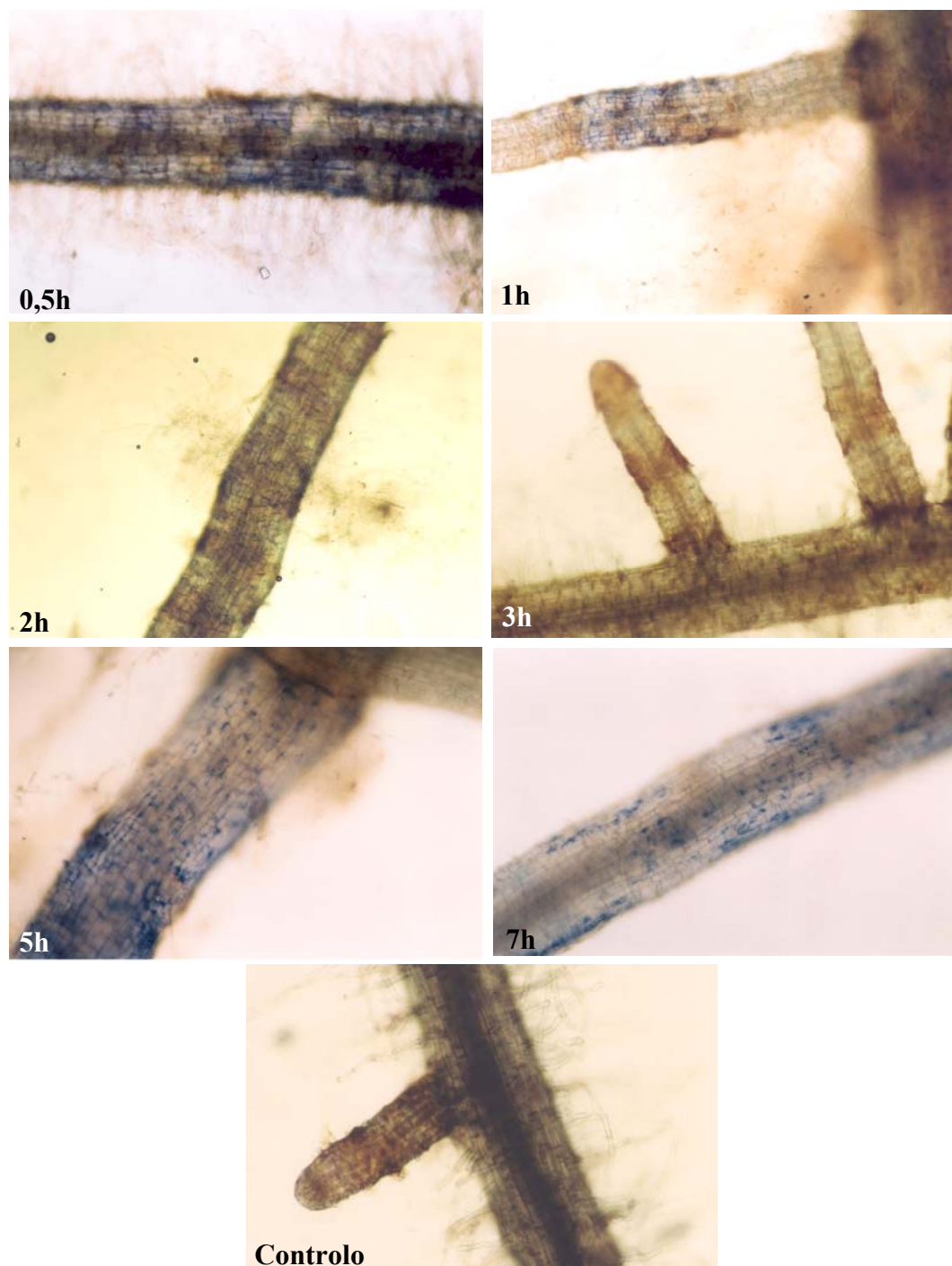
**Tabela 5.8** Níveis de  $H_2O_2$  em raízes de *Castanea sativa* no decurso das primeiras 48 horas após a eliciação com *Hypholoma fasciculare*. Os valores são apresentados na forma média  $\pm$  desvio padrão (n=3). Valores com a mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de  $p < 0,05$ .

Tempo (h)	$[H_2O_2]$ ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ Pf)	Significância
0	5,9 $\pm$ 2,0	b
0,5	7,3 $\pm$ 1,9	ab
1	6,7 $\pm$ 2,2	ab
2	6,4 $\pm$ 0,7	ab
3	4,7 $\pm$ 0,6	bc
5	5,7 $\pm$ 1,1	b
7	9,8 $\pm$ 3,4	a
9	9,5 $\pm$ 3,9	a
11	2,1 $\pm$ 1,0	c
15	6,9 $\pm$ 1,0	ab
24	4,2 $\pm$ 2,2	bc
48	5,7 $\pm$ 2,4	b

vezes) aos das raízes não sujeitas ao contacto com o fungo, ao fim de 3 horas. O segundo pico, com maior intensidade, ocorreu ao fim de 7-9 horas após a eliciação, com um acréscimo significativo face às plântulas não eliciadas de 1,5 vezes. Os valores de  $H_2O_2$  registados neste intervalo de tempo foram também significativamente superiores (cerca de 1,7 vezes) comparativamente aos observados em raízes após 5 horas de contacto com o fungo. Ao fim de 11 horas após a eliciação registou-se um decréscimo dos níveis de  $H_2O_2$  apresentando valores significativamente inferiores (2,9 vezes) aos de plântulas não eliciadas. O terceiro pico de produção de  $H_2O_2$  verificou-se ao fim de 15 horas de contacto com o fungo, apresentado um acréscimo significativo de 1,2 e 3,3 vezes face às plântulas controlo e às plântulas eliciadas após 11 horas de contacto com o fungo, respectivamente. Após um ligeiro decréscimo, os níveis de  $H_2O_2$  mantiveram-se praticamente constantes, apresentando valores abaixo ou muito similares aos das raízes não eliciadas.

### ***Anião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )***

A avaliação da produção do anião superóxido foi efectuada pela sua detecção histoquímica em raízes de *C. sativa* durante as primeiras horas de contacto (0,5 - 7h) com o fungo *H. fasciculare*. Como controlo, foram utilizadas raízes de castanheiro não eliciadas. Os resultados revelam que o fungo induziu a produção de anião superóxido, sobretudo ao nível das raízes secundárias (Figura 5.25). Esta produção foi dependente do tempo de contacto raiz-fungo, sendo possível observar dois picos de produção. O primeiro pico foi registado ao fim de 0,5-1 hora de contacto raiz-fungo, restringindo-se a produção de  $O_2^{\cdot-}$  a zonas específicas da raiz, confinadas às células epidérmicas. Após ausência de coloração azulada, indicativa da redução do NBT pelo anião superóxido, entre as 2 e as 3 horas de contacto raiz-fungo, um segundo pico com maior intensidade foi observado ao fim de 5-7 horas de inoculação. Tal como detectado para a interação *C. sativa* – *P. tinctorius*, neste segundo pico a acumulação de  $O_2^{\cdot-}$  ocorreu intracelularmente. Nas raízes não eliciadas não foi observado o aparecimento de coloração azul, indicativa da produção de anião superóxido, em nenhum dos tempos estudados.



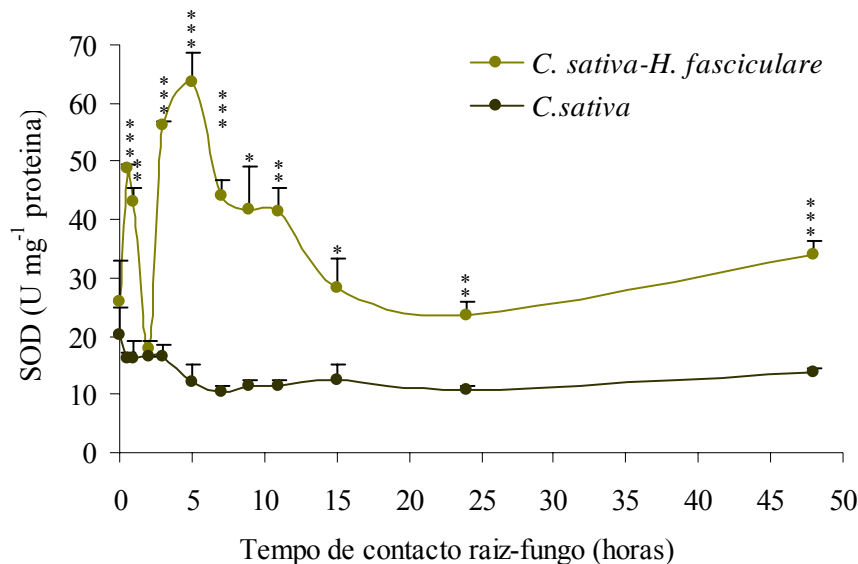
**Figura 5.25** Detecção *in situ* do anião superóxido, pelo método da redução de NBT, em raízes de *Castanea sativa* inoculadas com o fungo *Hypholoma fasciculare*, após as primeiras horas de contacto (0,5 – 7 horas). A produção do anião superóxido é evidenciada pela acumulação de precipitados de formazano (coloração azul). Raízes não inoculadas foram utilizadas como controlo (ampliação 100x).

### 5.2.2.5 Actividade de enzimas de stresse oxidativo

A actividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) foi determinada nas primeiras horas de contacto entre raízes de castanheiro e micélio de *H. fasciculare*. Como controlos foram determinadas as actividades destas enzimas para os mesmos tempos em raízes de castanheiro não eliciadas.

#### *Superóxido dismutase (SOD)*

Em todos os tempos de contacto, com excepção das 0 e 2 horas, as raízes de castanheiro eliciadas com *H. fasciculare* apresentavam uma actividade de SOD significativamente superior à de raízes não eliciadas (Figura 5.26). A actividade da SOD apresentou ainda uma variação ao longo do tempo de contacto raiz-fungo, tendo-se registado dois picos de actividade (Figura 5.26, Tabela 5.9). O primeiro pico ocorreu ao fim de 30 min após a inoculação, apresentando um acréscimo significativo de 3,0 e 1,9 vezes face às plântulas não eliciadas e imediatamente após inoculação (0 horas), respectivamente. Seguidamente, a actividade da SOD decresceu até às 2 horas após a inoculação atingindo valores muito similares aos observados nas raízes de castanheiro



**Figura 5.26** Actividade da SOD em raízes de *Castanea sativa* após terem sido inoculadas com *Hypholoma fasciculare* (*C. sativa* – *H. fasciculare*). Raízes de plântulas não inoculadas foram utilizadas como controlo (*C. sativa*). A barra indica média  $\pm$  ep (n=3). As diferenças estatisticamente significativas entre plântulas inoculadas e não inoculadas, para o mesmo tempo de inoculação, são indicados por \* para  $p < 0,05$ ; \*\* para  $p < 0,01$ ; \*\*\* para  $p < 0,001$ .

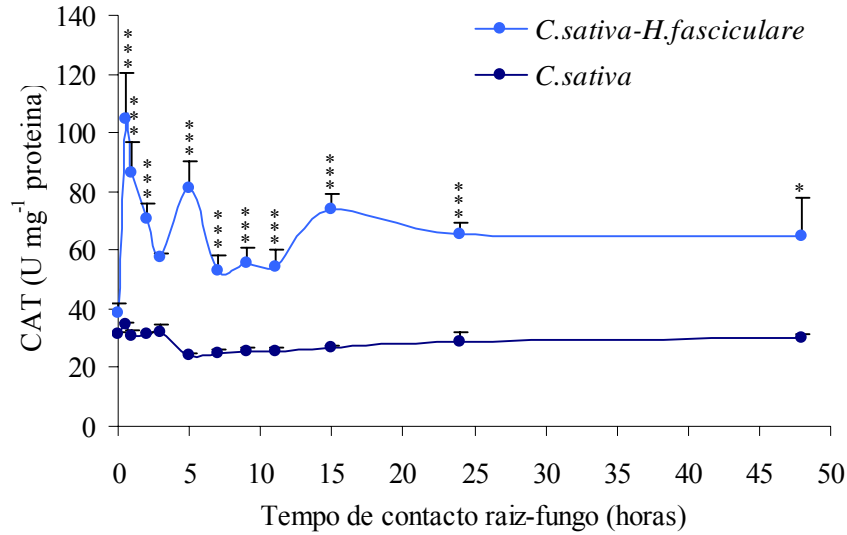
**Tabela 5.9** Actividade da SOD em raízes de *Castanea sativa* inoculadas com *Hypholoma fasciculare* determinada no decurso das primeiras 48 horas de contacto. Os valores de actividade da SOD são apresentados na forma média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ). Valores com a mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de  $p<0,05$ .

Tempo (h)	Actividade da SOD (U mg <sup>-1</sup> proteína)	Significância
0	26,0 $\pm$ 11,9	def
0,5	48,8 $\pm$ 1,2	abc
1	43,2 $\pm$ 4,1	bcde
2	17,9 $\pm$ 2,2	f
3	56,4 $\pm$ 0,6	ab
5	63,7 $\pm$ 8,3	a
7	44,2 $\pm$ 4,5	abcd
9	41,9 $\pm$ 12,7	bcde
11	41,3 $\pm$ 7,3	bcde
15	28,4 $\pm$ 8,7	def
24	23,7 $\pm$ 4,0	ef
48	34,1 $\pm$ 3,6	cdef

não eliciadas. O segundo pico, correspondente ao valor máximo da actividade foi observado ao fim de 5 horas após inoculação. Este valor de actividade foi significativamente superior em relação ao valor obtido para raízes não eliciadas e em raízes 2 horas após a inoculação, respectivamente, 5,2 e 3,6 vezes. A actividade da SOD decresce novamente, apesar de apresentar uma ligeira tendência para aumentar nas últimas 24 horas consideradas. Este aumento no valor de actividade não é, no entanto, estatisticamente diferente do registado em raízes 9 horas após a inoculação.

### ***Catalase***

As raízes de castanheiro inoculadas com *H. fasciculare* apresentaram, para todos os tempos de interacção (com excepção das 0 e 3 horas), valores de actividade da CAT significativamente superiores aos de raízes não inoculadas (Figura 5.27). A actividade



**Figura 5.27** Actividade da CAT em raízes de *Castanea sativa* após terem sido inoculadas com *Hypholoma fasciculare* (*C. sativa* – *H. fasciculare*). Raízes de plântulas não inoculadas foram utilizadas como controlo (*C. sativa*). A barra indica média ± ep (n=3). As diferenças estatisticamente significativas entre plântulas inoculadas e não inoculadas, para o mesmo tempo de inoculação, são indicados por \* para  $p < 0,05$ ; \*\*\* para  $p < 0,001$ .

**Tabela 5.10** Actividade da CAT em raízes de *Castanea sativa* inoculadas com *Hypholoma fasciculare* no decurso das primeiras 48 horas de contacto. Os valores de actividade da CAT são apresentados na forma média ± desvio padrão (n=3). Valores com a mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de  $p < 0,05$ .

Tempo (h)	Actividade da CAT (U mg <sup>-1</sup> proteína)	Significância
0	38,9±8,2	c
0,5	104,8±47,3	a
1	86,1±32,9	ab
2	70,6±16,8	abc
3	57,4±5,2	bc
5	80,8±28,6	ac
7	53,1±16,2	bc
9	55,4±15,6	bc
11	54,4±17,7	bc
15	74,0±16,3	abc
24	65,3±12,8	bc
48	64,9±38,1	bc

da CAT apresentou variações ao longo do tempo de contacto com o fungo, tendo-se registado três picos de indução da sua actividade (Figura 5.27, Tabela 5.10). O primeiro pico, observado ao fim de meia hora de inoculação, correspondeu ao maior valor de actividade registado e foi significativamente superior em 3,0 e 2,7 vezes ao de plantas não inoculadas e ao de plantas imediatamente após inoculação (0 horas), respectivamente. Contudo, foi no segundo pico, observado ao fim de 5 horas após a inoculação, que se registou a maior diferença de actividade da CAT (3,4 vezes superior) em relação a raízes não inoculadas. No entanto, este valor de actividade não foi estatisticamente diferente do registado em plântulas inoculadas ao fim de 3 horas de contacto com o fungo. O terceiro pico ocorreu 15 horas após a inoculação, apresentando um acréscimo significativo de 2,8 vezes face ao exibido por plântulas não inoculadas. Também para este tempo de contacto raiz-fungo não foram observadas diferenças estatísticas na actividade da CAT comparativamente com raízes inoculadas ao fim de 11 horas de contacto. Após um ligeiro decréscimo, a actividade da CAT manteve-se praticamente constante, até às 48 horas de inoculação.

## 5.3 DISCUSSÃO

### 5.3.1 Interação *Castanea sativa* - *Pisolithus tinctorius*

A formação de ectomicorrizas é um processo altamente complexo, caracterizado por uma sequência de eventos que permite a aderência do fungo à raiz, a agregação das hifas à superfície radicular para a formação do manto e finalmente a penetração das hifas nos espaços intercelulares da raiz para a formação da rede de Hartig (Martin *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2001a). A compatibilidade entre planta-fungo implica a existência de mecanismos, na planta hospedeira, que reconheçam claramente a presença de microrganismos simbióticos e transmitam essa informação ao núcleo, promovendo uma resposta adequada que seja capaz de os discriminar relativamente aos microrganismos patogénicos (Smith & Read, 1997).

Em interações incompatíveis planta-patogénico, a invasão dos tecidos vegetais pelo patogénico induz a activação de uma série de mecanismos de defesa na planta hospedeira que pretende prevenir a penetração e a progressão do agente invasor (Lamb & Dixon, 1997). Vários trabalhos efectuados ao nível do estudo de interações planta-microrganismos benéficos (tais como fungos micorrízicos ou bactérias fixadoras de azoto) sugerem que, durante os estádios iniciais da invasão do microrganismo, ocorre a indução de uma resposta de defesa na planta hospedeira similar à induzida por microrganismos patogénicos, sendo suprimida nos estádios mais avançados da associação simbiótica (Martin *et al.*, 2001b; García-Garrido & Ocampo, 2002; Mithöfer, 2002). De facto, o reduzido número de trabalhos desenvolvidos com fungos ectomicorrízicos, comparativamente aos fungos arbusculares, sugere um aumento transiente da resposta de defesa na planta hospedeira, durante os estádios iniciais da formação ectomicorrízica, e a sua supressão nos estádios mais avançados (Schwacke & Hager, 1992; Albrecht *et al.*, 1994; Salzer *et al.*, 1996; Salzer *et al.*, 1997a; Salzer *et al.*, 1997b). Estas evidências têm sido confirmadas, nos últimos anos, pelo estudo da expressão diferencial de genes em raízes colonizadas por fungos ectomicorrízicos (Duplessis *et al.*, 2005; Le Quéré *et al.*, 2005).

Apesar de existirem alguns dados sugerindo o envolvimento de espécies reactivas de oxigénio e de enzimas de stresse oxidativo na eliciação de raízes por fungos ectomicorrízicos, a inoculação directa de raízes com micélio nunca foi até à data utilizada neste tipo de estudos.

No presente trabalho, o contacto imediato entre o fungo ectomicorrízico *P. tinctorius* e o sistema radicular de *C. sativa* foi promovido pela utilização de um sistema de hidroponia, permitindo avaliar este tipo de resposta de defesa, na planta hospedeira, durante as primeiras 48 horas de interacção entre os simbiontes. O sistema hidropónico permitiu o contacto físico entre as raízes e o fungo logo após 2 horas de eliciação, tal como avaliado por microscopia electrónica de varrimento. Este sistema *in vitro* parece ser assim indicado para efectuar estudos relacionados com a produção de sinais entre os simbiontes durante as primeiras fases de contacto entre planta e fungo. Este aspecto poderá ser particularmente relevante, uma vez que o contacto célula-célula tem sido sugerido por diversos investigadores como sendo fundamental no processo de sinalização em ectomicorrizas (revisto por Sirrenberg *et al.*, 1995). Ao fim de 12 horas de eliciação, as hifas de *P. tinctorius* apresentavam-se dispostas em camadas em toda a zona de contacto com a raiz de castanheiro. Esta estrutura multicelular, que poderá corresponder a um manto muito incipiente, provavelmente resulta da promoção da adesão do fungo à raiz da planta hospedeira, induzida pela troca de sinais entre os simbiontes. Neste processo, tal como tem vindo a ser evidenciado, poderão estar envolvidas proteínas secretadas pelo fungo ectomicorrízico com propriedades específicas ao nível da adesão celular (lectinas, adesinas e hidrofobinas) (Giollant *et al.*, 1993; Gross *et al.*, 2004; Duplessis *et al.*, 2005). Esta hipótese é corroborada pelos resultados de Santos (2006) e Sebastiana (2006) que, recorrendo a um sistema hidropónico idêntico ao utilizado neste trabalho, verificaram que às 12 horas de contacto ocorre a expressão máxima de determinados genes, quer no fungo *P. tinctorius* quer na planta *C. sativa*. Ao fim de 24 horas de eliciação, cortes transversais radiculares de *C. sativa* mostraram não existir ainda penetração das hifas para a formação da rede de Hartig.

### ***Envolvimento de espécies reactivas de oxigénio***

A resposta de defesa despoletada nas plântulas de castanheiro, após inoculação com *P. tinctorius*, foi avaliada por medição dos níveis de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e implicação do sistema antioxidante na sua produção. Durante as primeiras 48 horas de interacção, três picos de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram registados ao fim de 2, 5 e 11 horas após inoculação, sugerindo o envolvimento desta espécie reactiva nos estádios iniciais do desenvolvimento ectomicorrízico. A rápida produção de ROS é um dos

acontecimentos que ocorre logo após a infecção da planta por patogêneos avirulentos (Lamb & Dixon, 1997; Wojtaszek, 1997). Vários trabalhos têm igualmente apontado a sua produção durante o desenvolvimento de associações micorrízicas. A primeira evidência de acumulação de ROS durante o desenvolvimento micorrízico com fungos arbusculares foi observada na associação *Medicago truncatula* - *Glomus intraradices* (Salzer *et al.*, 1999). Recorrendo a métodos histoquímicos, a acumulação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi sobretudo observada na superfície radicular onde ocorreu a penetração de hifas e nas células corticais da raiz que continham arbúsculos. Desde então, e apesar de nunca se ter quantificado os níveis de ROS, tem sido evidenciada a sua produção durante o desenvolvimento micorrízico arbuscular (García-Garrido & Ocampo, 2002). Em fungos ectomicorrízicos, a acumulação de ROS, em especial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, é apenas referida em estudos que resultam do tratamento de células de *Picea abies* com eliciadores da parede celular dos fungos ectomicorrízicos *Amanita muscaria* (Schwacke & Hager, 1992) e *Hebeloma crustuliniforme* (Salzer *et al.*, 1996).

A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> após inoculação com o fungo ectomicorrízico *P. tinctorius* reflecte uma condição de stresse oxidativo semelhante àquela observada em interações planta-microrganismo incompatíveis (Wojtaszek, 1997). Esta hipótese é ainda reforçada pela semelhança verificada entre o padrão da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> observado nas raízes de castanheiro e em diversas interações incompatíveis planta-patogêneo (Lamb & Dixon, 1997; Mahalingam & Fedoroff, 2003). Na interação incompatível, normalmente ocorre um aumento transiente de ROS, 1-2 horas após a infecção (fase I); seguida por uma outra fase de produção, de maior duração e intensidade, entre as 2-3 até às 5-6 horas após a infecção (fase II) (Lamb & Dixon, 1997; Mahalingam & Fedoroff, 2003). Os tempos de ocorrência de produção de ROS, bem como a sua intensidade, é variável, dependendo das espécies interactuantes (Wojtaszek, 1997; Bolwell *et al.*, 2002). Enquanto que a primeira fase de produção de ROS tem sido referida como uma reacção biológica não específica; a segunda fase de produção, é acompanhada algumas horas mais tarde pelo desenvolvimento da resposta hipersensível (HR) que se traduz pela morte das células em redor do local de infecção (Baker & Orlandi, 1995; Lamb & Dixon, 1997). Os dois primeiros picos de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, observados ao fim de 2 e 5 horas de contacto entre raízes de castanheiro e o fungo *P. tinctorius*, observados no presente trabalho, são coincidentes às fases I e II determinadas para as interações incompatíveis. Contudo, a indução de stresse oxidativo não desencadeou nenhuma

resposta hipersensível, não tendo sido observada morte celular e ocorrendo a massiva colonização das raízes de castanheiro pelo fungo. À semelhança do referido por (Tagu *et al.*, 2002) este resultado sugere que o fungo ectomicorrízico conseguiu ultrapassar os mecanismos de defesa da planta permitindo a sua invasão. Este carácter transiente da resposta de defesa foi sugerido como sendo uma consequência da baixa capacidade do fungo em activar os mecanismos de defesa da planta hospedeira (García-Garrido & Ocampo, 2002). Estes autores sugeriram igualmente a indução de um mecanismo na planta hospedeira capaz de suprimir esta resposta. A atenuação da resposta de defesa da planta pode ainda estar relacionada com a inactivação de eliciadores segregados pelo fungo, através da acção de enzimas hidrolíticas produzidas pela planta hospedeira, como é o caso das quitinases (Albrecht *et al.*, 1994; Salzer *et al.*, 1997a; Salzer *et al.*, 1997b). As auxinas produzidas pelo fungo ectomicorrízico durante o processo de colonização, têm igualmente revelado possuir um papel na inibição/atenuação da resposta de defesa induzida na planta hospedeira (Mensen *et al.*, 1998).

Em numerosas interações entre plantas e microrganismos patogénicos, incluindo fungos, bactérias e vírus, e ainda em cultura de células sujeitas a eliciadores, o  $H_2O_2$  tem sido indicado como sendo a principal espécie reactiva produzida (Wojtaszek, 1997). No entanto, dado haver produção de  $H_2O_2$  a partir do ião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) através da actividade da superóxido dismutase (SOD), o ião superóxido pode também ser uma das principais espécies reactivas a despoletar a resposta de defesa da planta hospedeira. De facto, em raízes de castanheiro eliciadas com o fungo *P. tinctorius* foi possível detectar dois picos de produção de  $O_2^{\cdot-}$ , ao longo do tempo de interacção raiz-fungo. O primeiro ocorreu ao fim de 0,5-1 hora e o segundo pico, de maior intensidade, ocorreu ao fim de 5-7 horas de contacto com o fungo. A semelhança no padrão de ocorrência entre  $O_2^{\cdot-}$  e o  $H_2O_2$ , para os dois primeiros picos de produção, sugere que ambas as espécies reactivas são produzidas durante a resposta decorrente da inoculação do *P. tinctorius* e que poderão ter uma geração interdependente. Na primeira fase, a produção de  $O_2^{\cdot-}$  parece ser extracelular, sugerindo que as primeiras reacções à presença do fungo ectomicorrízico ocorrem ao nível da parede e/ou membrana celular. Este aspecto é característico dos ataques por patogéneos, onde as principais vias enzimáticas de produção de ROS estão confinadas à membrana plasmática (NADPH oxidase) e à parede celular (peroxidases, xantina oxidase e amina oxidase) (Neill *et al.*, 2002; Apel & Hirt, 2004). No segundo pico, ao contrário do verificado para o primeiro, a produção

de  $O_2^{\cdot-}$  parece ocorrer intracelularmente, sendo possível observar microdomínios de acumulação de  $O_2^{\cdot-}$  no interior das células. Este resultado sugere que neste caso a produção de ião superóxido poderá estar dependente de vias de produção de ROS localizadas intracelularmente (Neill *et al.*, 2002; Apel & Hirt, 2004).

Apesar de não ter sido avaliada a produção de  $O_2^{\cdot-}$  em raízes de castanheiro após 11 horas de contacto com o fungo *P. tinctorius*, verificou-se a produção menos intensa de  $H_2O_2$  nesse período. Para além de um possível significado fisiológico, esta produção menos intensa de  $H_2O_2$  poderá reflectir apenas a indução/inibição dos mecanismos de decomposição das ROS promovida pelas enzimas de stresse oxidativo.

A eficiente dismutação do  $O_2^{\cdot-}$  e a decomposição do  $H_2O_2$  requer a acção de várias enzimas antioxidantes. De entre estas, a CAT e a SOD são as mais eficientes no controlo dos níveis destas espécies reactivas (Scandalios, 1993). No sistema estabelecido entre *C. sativa* e o fungo *P. tinctorius* foi observado que, durante as primeiras 48 horas de interacção, ocorriam variações na actividade da SOD e da CAT. Relativamente à SOD, os resultados parecem evidenciar que a variação da sua actividade é coincidente à variação verificada para o  $H_2O_2$ . De facto, o rápido aumento na actividade da SOD, registado ao fim de 2 horas de interacção raiz-fungo, é coincidente com o primeiro pico de produção de  $H_2O_2$ . Um resultado semelhante foi observado ao fim de 5 horas de interacção raiz-fungo. Dado que o  $H_2O_2$  é um dos produtos de reacção da SOD, este resultado corrobora a possível contribuição desta enzima para o aumento temporário dos níveis de  $H_2O_2$  em raízes de *C. sativa* após eliciação com *P. tinctorius*, à semelhança do sugerido por outros autores (Schwacke & Hager, 1992; Johansson *et al.*, 2004; Morel *et al.*, 2005). Adicionalmente, este aumento de actividade na SOD pode constituir uma estratégia para a eliminação dos iões superóxido produzidos durante as primeiras horas de eliciação.

Simultaneamente ao aumento da actividade da SOD, observado ao fim de 2 horas de inoculação com *P. tinctorius*, foi registada uma diminuição da actividade da CAT, contribuindo igualmente para o aumento dos níveis de  $H_2O_2$  registado neste tempo de interacção. O segundo aumento de actividade da CAT, registado ao fim de 3 horas de inoculação, é coincidente com uma diminuição dos níveis de  $H_2O_2$ . A activação temporária da CAT parece ser relevante na protecção da planta hospedeira contra o aumento da produção ROS, evitando possíveis danos celulares (morte celular). Em associações ectomicorrízicas, o envolvimento da CAT e da SOD na regulação de

produção de ROS foi sugerido em cultura de células em suspensão de *Picea abies* eliciadas com fragmentos da parede celular dos fungos *H. crustuliniforme* e *A. muscaria* (Schwacke & Hager, 1992). Recentemente, alguns trabalhos sobre o estudo da expressão diferencial de genes durante o desenvolvimento ectomicorrízico têm comprovado esta hipótese. Durante o desenvolvimento ectomicorrízico entre *Betula pendula* e *Paxillus involutus* verificou-se um aumento de 8 vezes nos níveis de expressão de um gene codificante para a SOD dependente de manganésio nas raízes micorrizadas em relação ao fungo em cultura pura (Morel *et al.*, 2005). No mesmo sistema micorrízico, resultados semelhantes já tinham sido referidos, tendo-se registado nas raízes micorrizadas aumentos de expressão na ordem de 2 vezes de um gene codificante da SOD em relação ao fungo em cultura pura (Johansson *et al.*, 2004). Contudo, Martins (2004) ao estudar a activação de enzimas antioxidantes, decorrentes da inoculação de plântulas de castanheiro com o fungo *P. tinctorius*, verificou não existirem diferenças significativas ao nível da SOD, da ascorbato peroxidase e da glutathione redutase, entre plântulas micorrizadas e não-micorrizadas. A autora atribui estes resultados ao facto de não se ter efectuado a monitorização destas enzimas para tempos inferiores a 24 horas de interacção planta-fungo, altura em que possivelmente ocorreriam mecanismos de tipo oxidativo. De facto, apesar de terem sido observados elevados aumentos de CAT e SOD nas primeiras 11 horas de interacção com *P. tinctorius*, ambas as actividades tendem a diminuir a partir deste tempo, atingindo valores próximos aos das plantas controlo ao fim de 48 horas. Apesar da actividade da CAT se apresentar baixa em raízes de castanheiro, entre as 15 e as 48 horas após inoculação, parece ser suficiente para manter os níveis de  $H_2O_2$  abaixo da toxicidade, os quais apresentam para o mesmo tempo de eliciação valores significativamente superiores ao controlo. Este resultado sugere que estes níveis elevados de  $H_2O_2$  devam contribuir para vias de transdução do sinal essenciais para o desenvolvimento ectomicorrízico. Face ao exposto, no sistema *C. sativa*-*P. tinctorius*, a acção conjunta da SOD e da CAT parece controlar de um modo bastante preciso os níveis de  $O_2^{\cdot-}$  e de  $H_2O_2$  evitando que os níveis se tornem nocivos para o sistema.

### ***Efeito de extractos de raízes eliciadas no crescimento do fungo micorrízico***

Vários compostos identificados em exsudados e/ou extractos de raiz têm sido referidos como tendo um papel importante nas propriedades físicas e químicas da

rizosfera, e no estabelecimento da comunicação raiz-microrganismos (revisto por Hirsch *et al.*, 2003; Bais *et al.*, 2004). No presente trabalho, pretendeu-se avaliar o efeito de extractos proteicos de raízes de castanheiro eliciadas com o fungo *P. tinctorius*, no crescimento deste fungo ectomicorrízico. Os resultados indicam que, de um modo geral, a presença de extractos radiculares de *C. sativa* estimulam o crescimento de *P. tinctorius*, a partir dos 14 dias de cultura. A promoção no crescimento de fungos ectomicorrízicos e arbusculares, por parte de exsudados e/ou extractos radiculares, tem sido referida em algumas interações micorrízicas (revisto por Giovannetti & Sbrana, 1998; Lum & Hirsch, 2003). De entre os compostos secretados em exsudados radiculares, a rutina (Lagrange *et al.*, 2001b), a zeatina (Barker & Tagu, 2000; Martin *et al.*, 2001b), os flavonóides e isoflavonóides (Kapulnik *et al.*, 1996; Weiss *et al.*, 1997; Harrison, 1999; Lum & Hirsch, 2003) têm sido apontados como tendo um efeito indutor no crescimento micelial. Curiosamente, o efeito estimulador dos extractos radiculares de *C. sativa* eliciados por *P. tinctorius* no crescimento do fungo não foi tão evidente nos primeiros 8 dias de cultura, verificando-se inclusivamente para alguns extractos um efeito inibidor. De facto, logo após a inoculação verificou-se existir uma inibição significativa do crescimento quando eram utilizados os extractos de raízes em contacto com o fungo durante 3 a 9 horas e também às 15 horas. Este efeito inibitório pode ser o resultado da produção de alguns compostos em consequência da inoculação com *P. tinctorius*, deixando de ser observado a partir dos 14 dias de ensaio provavelmente devido à sua degradação e/ou inactivação por parte do fungo cultivado. O decréscimo verificado na estimulação do crescimento de *P. tinctorius* por parte de extractos proteicos de raízes poderá ser relevante durante o processo de ectomicorrização. A restrição no crescimento e consequentemente da invasão dos tecidos da planta hospedeira de fungos diferentes daquele que iniciou o processo de micorrização (inclusivamente da mesma espécie) poderá, de certa forma, promover o estabelecimento da associação simbiótica. Esta hipótese necessita, no entanto, de confirmação mediante a realização de ensaios semelhantes utilizando espécies fúngicas diferentes.

Um estímulo evidente no crescimento do fungo *P. tinctorius* foi observado 14 dias após a inoculação, em meio de cultura contendo extractos de raízes não eliciadas (0 horas após inoculação) e eliciadas até às 2 horas, ao fim de 11 horas e após as 24 horas. De salientar que nos extractos preparados a partir de raízes eliciadas com pouco

tempo de contacto com o fungo (0,5 a 2 horas de contacto) o efeito no crescimento de *P. tinctorius* é muito idêntico ao das raízes não eliciadas (0 horas). Os efeitos mais evidentes só são observados quando extractos preparados após 3 horas de contacto são utilizados, o que poderá corresponder ao tempo necessário para a percepção, transdução de sinal e expressão de genes que participem na regulação do crescimento do fungo.

Analisando a capacidade estimuladora/inibidora de crescimento do fungo ao longo do tempo de eliciação dos extractos radiculares, verifica-se um padrão muito semelhante ao observado para a variação dos níveis de  $H_2O_2$ . Nos extractos de raiz de castanheiro eliciados entre as 3 e 9 horas e ao fim de 15 horas, a estimulação do crescimento de *P. tinctorius* foi reduzida, apresentando pelo menos duas reduções significativas da capacidade estimuladora do crescimento. Esse padrão mantém-se ao longo de todo o período de crescimento do fungo, mesmo quando ainda não eram detectáveis estímulos significativos do seu crescimento nas placas contendo extractos de raiz não eliciada (até aos 11 dias de incubação). A semelhança de padrão verificada entre produção de  $H_2O_2$  (2 h, 5 h e 11 h de interacção raiz-fungo) e a redução da capacidade estimuladora de crescimento do fungo (3 h, 9 h e 15 h de interacção raiz-fungo) sugere que estes dois fenómenos possam estar de algum modo relacionados. Apesar do  $H_2O_2$  produzido pelas raízes de castanheiro não explicar directamente a redução do estímulo verificado no crescimento fúngico (até porque possivelmente esta ROS seria completamente degradada no decurso dos 30 dias em que demorou o ensaio), poderá desempenhar funções ao nível da sinalização. O papel desempenhado pelo  $H_2O_2$ , produzido durante as interacções incompatíveis planta-patogéneo, tem sido controverso (Neill *et al.*, 2002). O facto da produção de ROS estar intimamente relacionada com o aparecimento da resposta hipersensível, associada à sua elevada toxicidade, sugere que estas sejam as principais responsáveis pelos efeitos citotóxicos (Bowler & Fluhr, 2000). No entanto, a elevada difusibilidade exibida pelo  $H_2O_2$  através das membranas celulares e a sua maior estabilidade comparativamente às restantes ROS, apontam para que esta molécula tenha uma acção preponderante na sinalização intracelular e na regulação da expressão genética (Mehdy *et al.*, 1996; Foyer *et al.*, 1997; De Gara *et al.*, 2003). Em conformidade, estudos recentes sugerem que a produção de ROS, e em especial do  $H_2O_2$ , estejam particularmente implicadas, como moléculas sinalizadoras, na resposta a vários estímulos bióticos e abióticos (Laloi *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 2006). Estas respostas incluem reacções de defesa a ataques por patogéneos e herbívoros,

encerramento dos estomas, excesso de luz, exposição ao ozono, regulação do crescimento celular e no desenvolvimento das plantas (Foyer *et al.*, 1997; Mittler, 2002; Neill *et al.*, 2002; Laloi *et al.*, 2004).

O possível envolvimento do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como molécula sinalizadora na interação *C. sativa* - *P. tinctorius* é corroborado pelos resultados obtidos por Sebastiana (2006). Utilizando um sistema micorrízico semelhante ao usado no presente trabalho, foi observada indução da expressão de genes codificantes de cinases receptoras em raízes de castanheiro, ao fim de 12 horas de interação com o fungo. As cinases receptoras constituem uma família multigénica de proteínas associadas à membrana plasmática do hospedeiro, envolvidas na percepção e transmissão de sinais exteriores (Shiu *et al.*, 2004), cuja indução parece estar relacionada com a presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Desikan *et al.*, 2000). A acção indutora do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na expressão de genes codificantes de cinase receptoras foi demonstrada após tratamento de células em suspensão de *Arabidopsis thaliana* com adição exógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Desikan *et al.*, 2000). A indução da expressão de proteínas cinases receptoras tem também sido observada noutras simbioses ectomicorrízicas (Krüger *et al.*, 2004) e em endosimbioses (nódulos fixadores de azoto e micorrizas arbusculares) (Stracke *et al.*, 2002; Madsen *et al.*, 2003; Kuster *et al.*, 2004; Guimil *et al.*, 2005). Estes resultados corroboram a hipótese do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intervir como molécula sinalizadora na expressão de genes que eventualmente participem no desenvolvimento ectomicorrízico.

A avaliação macroscópica das colónias de *P. tinctorius*, em crescimento na presença de extractos radiculares de plântulas de castanheiro eliciadas por *P. tinctorius* ou tampão de extracção (controlo), não evidenciaram diferenças. Os resultados decorrentes desta avaliação macroscópica mostram que a presença de extractos radiculares eliciados não induziram alterações morfológicas no fungo, nem a síntese de pigmentos que pudessem alterar a coloração das culturas. Este último aspecto é relevante uma vez que muitas micotoxinas são pigmentadas, como por exemplo, as naftoquinonas de *Penicillium* e *Aspergillus* (Loguercio-Leite *et al.*, 2006). Por outro lado, certos pigmentos têm função antioxidativa, como por exemplo os β-carotenos e a torularodina (Loguercio-Leite *et al.*, 2006).

### 5.3.2 Interação *Castanea sativa* – *Hypholoma fasciculare*

O fungo *Hypholoma fasciculare*, descrito como fungo saprófita-lenhícola, é uma espécie com elevada distribuição mundial, podendo ocorrer em florestas tropicais, temperadas e boreais (Boddy, 1999). No nordeste transmontano, este fungo é encontrado quer em povoamentos de castanheiro quer noutros ecossistemas agro-florestais (Capítulo 3; Branco, 2003; Baptista *et al.*, 2005). Apesar da sua elevada ocorrência, tanto quanto é do nosso conhecimento, não são referidos estudos sobre o efeito directo deste fungo no crescimento e sanidade das plantas. Este aspecto reveste-se de elevada importância uma vez que o fungo *H. fasciculare* tem sido utilizado com alguma frequência, nos últimos anos, como agente biológico no controlo de patogéneos que provocam a podridão de raízes (*Armillaria* sp.) (Chapman *et al.*, 2004; Cox & Scherm, 2006). Estudos neste âmbito foram apenas realizados para os fungos saprófitas *Trichoderma harzianum* (Yedidia *et al.*, 1999), *Phlebiopsis gigantea*, *Marasmius androsaceus*, *Trichoderma aureoviride* e *Coriolus versicolor* (Asiegbu *et al.*, 1999), alguns dos quais, à semelhança do *H. fasciculare*, são usados como agentes biológicos no controlo de patogéneos do solo.

A presença de *H. fasciculare* nos sotos transmontanos e o facto de aparecer associado a fungos ectomicorrízicos (*Amanita muscaria*) justificou, no presente trabalho, o estudo do efeito desta espécie fúngica na sanidade de plântulas de castanheiro, avaliando a sua capacidade de adesão a raízes de castanheiro e as respostas de defesa da planta à inoculação por este fungo. Para tal, recorreu-se ao mesmo sistema de hidroponia utilizado no estudo da interação *C. sativa* - *P. tinctorius*, de modo a permitir o contacto imediato entre o fungo e as raízes de plântulas de castanheiro, constituindo, assim, um sistema controlado para avaliar, ao longo do tempo, a interação raiz-fungo.

#### **Adesão do fungo à raiz de castanheiro**

A adesão à superfície de órgãos da planta hospedeira constitui o processo inicial de infecção de fungos patogénicos, do qual depende em grande parte o sucesso da patogenicidade (Epstein & Nicholson, 1997). No sistema *in vitro* estabelecido entre *C. sativa* e o fungo *H. fasciculare*, as observações por microscopia electrónica de varrimento mostraram uma elevada aderência das hifas à superfície radicular, logo 48

horas após a inoculação. A adesão aumenta ao longo do tempo de contacto raiz-fungo, sendo possível observar ao fim de 25 dias, uma camada compacta de hifas a envolver toda a superfície radicular. Após 60 dias de contacto com o fungo *H. fasciculare*, a observação de secções transversais de raízes de castanheiro evidenciaram que os vasos xilémicos apresentavam-se obstruídos. A obstrução de vasos xilémicos foi já descrita com sendo uma resposta frequente à infecção por fungos patogénicos vasculares tais como *Fusarium oxysporum* (Resende *et al.*, 1996; Trillas *et al.*, 2000), *Verticillium dahliae* (Hammond-Kosack & Jones, 1996; Williams *et al.*, 2002), *Ceratocystis fimbriata* (Clérivet *et al.*, 2000) e *Leptosphaeria maculans* (Roussel *et al.*, 1999). De facto, a oclusão de vasos condutores por géis vasculares ou gomas tem vindo a ser descrito como um mecanismo que visa sobretudo a limitação do crescimento do microrganismo patogénico nos tecidos vasculares (Kpémoua *et al.*, 1996; Trillas *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2002). A origem desta substância gomosa ou material gelificado é muito controversa. Segundo Crews (1998), o seu aparecimento resulta da hidrólise de determinados materiais que compõem a parede das células. Uma outra hipótese sugere a ocorrência de síntese *de novo* do material gelificado pelas células do parênquima xilémico (Rioux *et al.*, 1998). Nalgumas interações planta-fungo, a natureza deste material oclusivo encontra-se descrita como contendo pectina, calose, celulose e lenhina (Kpémoua *et al.*, 1996; Rioux *et al.*, 1998; Roussel *et al.*, 1999; Clérivet *et al.*, 2000; Trillas *et al.*, 2000).

A oclusão dos vasos xilémicos de raízes de *C. sativa*, em resposta à inoculação com *H. fasciculare*, foi coincidente com o aparecimento de sintomas de deficiência em água na planta. As folhas, sobretudo as mais jovens, exibiam clorose precoce, após 60 dias de contacto das raízes com o fungo. Este amarelecimento acentuou-se até as folhas acabarem por murchar e caírem prematuramente. Estes sintomas são idênticos aos verificados em plantas que apresentam o tipo de resposta de defesa estrutural à invasão por patogéneos vasculares, o que sugere que o transporte de água e sais minerais ao nível do xilema, fica comprometido pela obstrução dos vasos xilémicos (Dong *et al.*, 1997). Esta sugestão é corroborada pelo facto do amarelecimento das folhas de castanheiro ter início ao nível das nervuras, progredindo a toda a superfície do limbo.

A obstrução dos vasos condutores como resposta à eliciação com o fungo *H. fasciculare*, espécie descrita como saprófita-lenhícola, não tinha sido previamente

referida. Contudo, ao contrário do descrito para interações com fungos patogénicos vasculares, não foi verificada a penetração das hifas de *H. fasciculare* nos vasos condutores nem nouro tecido radicular. Apesar de necessitar de confirmação, este resultado sugere que a produção deste tipo de materiais nos vasos xilémicos radiculares, observado na interação *C. sativa* - *H. fasciculare*, provavelmente desempenha funções diferentes à vulgarmente associada ao ataque por fungos patogénicos vasculares. Várias evidências têm sugerido que a produção deste tipo de materiais não resulta exclusivamente de ataques por patógenos, tendo sido já referida a sua produção em plantas após imposição de stresse abióticos (ferimentos) (Moerschbacher & Mendgen, 2001).

### **Síntese de hidrofobinas por *Hypholoma fasciculare***

O processo de adesão de fungos patogénicos ou simbióticos à superfície da planta hospedeira está associado a compostos com função de adesão, presentes numa matriz extracelular. De entre os compostos identificados destacam-se proteínas, como glicoproteínas de elevado peso molecular (Apoga *et al.*, 2001), e glúcidos (Mendgen *et al.*, 1996). Para além de compostos com propriedades adesivas, as interações hidrofóbicas estabelecidas entre as hifas e a superfície da planta são igualmente consideradas como essenciais no processo de adesão. Estas interações hidrofóbicas são mediadas pela presença, na matriz extracelular, de proteínas com cerca de 100 resíduos aminoácídicos - as hidrofobinas. Secretadas unicamente por fungos filamentosos (Wessels, 1997; Wösten *et al.*, 1999), as hidrofobinas, são caracterizadas por possuírem um baixo peso molecular (7-9 kDa) (Kwan *et al.*, 2006) e por exibirem propriedades de auto-reunião a interfaces hidrofílico/hidrofóbico, formando películas anfipáticas entre a parede polissacarídica das hifas fúngicas e a superfície hidrofóbica da planta (Wösten *et al.*, 1993; Wösten *et al.*, 1994; Wösten *et al.*, 1995; Talbot *et al.*, 1996; Wessels, 1996; Kershaw & Talbot, 1998; Wösten, 2001; Whiteford & Spanu, 2002). Para além do papel de adesão no processo da patogenicidade (Talbot *et al.*, 1996; Wessels, 1996; Wösten, 2001; Whiteford & Spanu, 2002), as hidrofobinas podem ter adicionalmente uma acção tóxica (Wösten, 2001), podendo ainda desempenhar outras funções ao nível do crescimento e do desenvolvimento dos fungos, e intervir na formação de ectomicorrízicas (Tagu *et al.*, 1996; Duplessis *et al.*, 2001; Voiblet *et al.*, 2001; Duplessis *et al.*, 2005).

A forte adesão das hifas fúngicas de *H. fasciculare* à superfície radicular de *C. sativa*, observada algumas horas após eliciação, pode estar associada à presença de hidrofobinas produzidas pelo fungo à semelhança do indicado para várias interações incompatíveis planta-patógeno (Wösten, 2001). A identificação de uma sequência nucleotídica, obtida a partir da amplificação de DNA genômico de *H. fasciculare*, que codifica possivelmente uma hidrofobina reforça, em parte, o envolvimento deste tipo de proteínas na adesão do fungo a raízes de castanheiro. Contudo, apenas a análise de expressão deste gene no decorrer do processo de infecção de raízes de castanheiro com o fungo *H. fasciculare* é que permitirá elucidar o seu envolvimento no processo de adesão fungo-raiz.

De modo a obter um fragmento da região codificante de hidrofobina, a ser utilizado como sonda nesta análise de expressão, foram desenhados iniciadores oligonucleotídicos degenerados para as regiões conservadas de hidrofobinas de basidiomicetos, editadas em bases de dados. Após amplificação termocíclica foi obtido um fragmento de 230 pb, que inclui uma sequência não traduzida (intrão) de 61 pb e uma ORF de 169 pb. A presença de intrões em genes codificantes de hidrofobinas fúngicas é muito vulgar, ocorrendo normalmente em número superior a um e com uma dimensão, compreendida entre 50 a 60 pb, dependendo da espécie fúngica (Martin *et al.*, 1999).

Apesar da sequência nucleotídica obtida neste trabalho não se encontrar completa foi possível deduzir um polipéptido de 56 aminoácidos, que apresenta elevada percentagem de identidade com hidrofobinas de basidiomicetos (67,9 e 32,1%), e em especial com a espécie *Pholiota nameko* (67,9 e 55,4%), igualmente pertencente à família Strophariaceae. Este resultado sugere que o fragmento amplificado contém regiões codificantes de hidrofobina de *H. fasciculare*, a qual passará a ser designada por *HydHf*. As hidrofobinas, bem como os respectivos genes codificantes têm sido identificados em várias espécies de ascomicetos e basidiomicetos (Wessels, 1997; Wösten, 2001) e, em menor extensão, em algumas espécies de zigomicetos (de Vries *et al.*, 1993). Encontram-se descritas até ao momento cerca de 70 genes codificantes de hidrofobinas numa grande variedade de espécies fúngicas, incluindo fungos saprófitas, cogumelos comestíveis, fungos patogénicos e simbioses (que formam ectomicorrizas e líquenes). Muitas destas espécies possuem vários tipos de hidrofobinas, tendo sido já identificadas 7 hidrofobinas em *Pisolithus tinctorius* (Tagu *et al.*, 1996; Duplessis *et al.*,

2001; Voiblet *et al.*, 2001; Duplessis *et al.*, 2005), 6 em *Pleurotus ostreatus* (Ásgeirsdóttir *et al.*, 1998; Penas *et al.*, 1998) e no fungo patogénico *Cladosporium fulvum* (Segers *et al.*, 1999).

A análise comparativa da sequência aminoacídica deduzida *HydHf* com outras sequências de hidrofobinas fúngicas evidenciou a existência de uma significativa homologia. De entre os vários resíduos aminoacídicos que compõem a sequência de *H. fasciculare*, os resíduos de cisteína (Cys<sup>69, 70, 107, 121, 127, 128</sup>) e de prolina (Pro<sup>109</sup>) foram os que se apresentaram mais conservados, estando presentes em todas as hidrofobinas analisadas. Este resultado corrobora a identidade da proteína deduzida uma vez que as hidrofobinas se caracterizam por possuírem uma distribuição conservada de 8 resíduos de cisteína (X<sub>n</sub>-C-X<sub>5-10</sub>-CC-X<sub>11-44</sub>-C-X<sub>8-23</sub>-C-X<sub>5-9</sub>-CC-X<sub>6-18</sub>-C-X<sub>m</sub>), separados por outros resíduos aminoacídicos (X), cuja maioria exhibe características apolares (Wessels, 1994; Wessels, 1996; Wessels, 1997; Kershaw & Talbot, 1998; Wösten, 2001; Linder *et al.*, 2005). Embora a hidrofobina deduzida de *H. fasciculare* exhiba apenas seis resíduos de cisteína, uma vez que se encontra incompleta, esta apresenta alguns resíduos aminoacídicos com características hidrofóbicas, cuja presença é relativamente conservada em sequências de hidrofobinas. Entre estes, destacam-se a leucina (Leu<sup>90</sup>), a isoleucina (Ile<sup>110</sup>), a valina (Val<sup>103, 126</sup>) e a glicina (Gly<sup>91, 104, 118</sup>).

Devido à sua elevada conservação, os resíduos de cisteína devem desempenhar funções críticas ao nível da estrutura proteica das hidrofobinas. De facto, estes oito resíduos de cisteína parecem estabelecer ligações dissulfeto intramoleculares (Linder *et al.*, 2005), contribuindo para um aumento da estabilidade da proteína (de Vocht *et al.*, 2000). Os restantes resíduos aminoacídicos, por apresentarem alguma divergência, devem ser os responsáveis pelas pequenas diferenças estruturais, associadas provavelmente a propriedades e/ou funções diferentes das diversas hidrofobinas (Kershaw & Talbot, 1998; Martin *et al.*, 1999; Linder *et al.*, 2005). Alguns autores têm referido que esta baixa similaridade das sequências de hidrofobinas tem dificultado a concepção de iniciadores oligonucleotídicos que permitam a amplificação de sequências nucleotídicas codificantes destas proteínas, comprometendo a sua identificação e isolamento (Whiteford & Spanu, 2002). Esta dificuldade reflectiu-se na concepção dos iniciadores oligonucleotídicos utilizados na amplificação da sequência nucleotídica codificante da hidrofobina do fungo *H. fasciculare*, tendo havido a necessidade de

seleccionar as duas regiões mais conservadas e correspondentes aos resíduos de cisteína que ocupavam posições muito próximas.

Apesar das diferentes hidrofobinas apresentarem reduzida similaridade na sequência aminoacídica, o seu perfil hidrofóbico é bastante similar (Wessels, 1996; Kershaw & Talbot, 1998; Martin *et al.*, 1999; Linder *et al.*, 2005). Esta característica é devida à presença das cisteínas conservadas em associação com resíduos aminoacídicos de natureza variável, mas com características hidrofóbicas, contribuindo significativamente para a hidrofobicidade final da proteína. A análise do perfil de hidrofobicidade da hidrofobina da sequência aminoacídica de *H. fasciculare* permitiu evidenciar a presença de um domínio hidrofóbico, com uma distribuição muito conservada ao nível das diferentes sequências de hidrofobinas analisadas, nomeadamente de *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* e especificamente com *Pholiota nameko* (espécie da mesma família que *H. fasciculare*).

Baseado nas diferenças existentes entre o perfil de hidrofobicidade e nas propriedades biofísicas, Wessels (1994), classificou as hidrofobinas em duas classes distintas; classe I e classe II. Este autor verificou que as diferenças entre estas duas classes residiam na solubilidade dos agregados por elas formados. Actualmente, mais características distintivas entre estas duas classes de hidrofobinas encontram-se descritas. Apesar das hidrofobinas, que integram ambas as classes, possuírem os 8 resíduos de cisteína e estarem todos envolvidos na formação de ligações dissulfeto, as hidrofobinas pertencentes à classe I apresentam uma variação no espaçamento entre os resíduos de cisteína, sendo este praticamente invariável nas hidrofobinas que integram a classe II (Kershaw & Talbot, 1998; Linder *et al.*, 2005). As hidrofobinas pertencentes à classe I caracterizam-se ainda por formarem películas anfipáticas mais estáveis e por apresentarem uma estrutura em bastonete, ambas as características não verificáveis nas hidrofobinas da classe II (Kwan *et al.*, 2006). Adicionalmente, foi sugerido que as hidrofobinas da classe II só existem em ascomicetos, enquanto que as hidrofobinas da classe I existem em basidiomicetos e ascomicetos (Linder *et al.*, 2005), o que indicia que as hidrofobinas da classe II possam ter evoluído em ascomicetos independentemente das hidrofobinas da classe I e depois da separação dos basidiomicetos (Whiteford & Spanu, 2002). Face ao exposto e com base no alinhamento das sequências e perfil de hidrofobicidade, é possível afirmar que a sequência aminoacídica deduzida de *HydHf* de *H. fasciculare* pertence à classe I, dado apresentar

características muito similares às exibidas por outras hidrofobinas fúngicas pertencentes a esta classe de hidrofobinas.

Com base no alinhamento de sequências aminoacídicas de hidrofobinas de várias espécies fúngicas, pertencentes às classes basidiomicetos e ascomicetos, efectuou-se o estudo filogenético de forma a permitir observar as relações evolutivas entre *HydHf* de *H. fasciculare* e outras hidrofobinas. Os resultados evidenciam uma clara distinção entre as hidrofobinas (todas elas pertencentes à classe I) de ascomicetos e basidiomicetos, o que está de acordo com o previamente referido (Whiteford & Spanu, 2002; Linder *et al.*, 2005). Alguns autores sugerem que esta separação filogenética se deva ao facto das hidrofobinas da classe I já existirem nos fungos filamentosos, previamente à ocorrência da sua divisão nas duas classes, basidiomicetos e ascomicetos (Whiteford & Spanu, 2002).

### ***Envolvimento de espécies reactivas de oxigénio***

A avaliação da indução de respostas de defesa em plântulas de castanheiro após inoculação com micélio de *H. fasciculare* foi efectuada pela quantificação de espécies reactivas de oxigénio (ROS), durante as primeiras 48 horas de interacção raiz-fungo. Os resultados evidenciaram a existência de três picos de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, registados 30 minutos, 7 e 15 horas após inoculação, cujo padrão é semelhante ao descrito para a interacção *C. sativa* – *P. tinctorius*. A indução de resposta do tipo oxidativo em plantas face à inoculação por fungos saprófitas nunca tinha sido referida, existindo apenas evidências de indução de proteínas de defesa (quitinase e peroxidase) e reforço da parede celular (deposição de calose), assim como necrose e morte celular (HR) (Asiegbu *et al.*, 1999; Yedidia *et al.*, 1999).

Tal como referido anteriormente, durante as interacções incompatíveis, a produção de ROS ocorre em duas fases distintas (fase I e II), havendo variabilidade no seu tempo de ocorrência e intensidade consoante as espécies interactuantes (Lamb & Dixon, 1997; Mahalingam & Fedoroff, 2003). Os dois primeiros picos de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em raízes de castanheiro eliciadas com *H. fasciculare* (0,5 e 7 horas de contacto) são coincidentes às fases I e II. Após uma primeira fase de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, provavelmente resultante do contacto inicial entre *C. sativa* – *H. fasciculare*, o segundo pico de produção poderá ser o resultado da activação dos mecanismos de defesa das plântulas de *C. sativa* após

reconhecimento dos eliciadores sintetizados por *H. fasciculare*. Este segundo pico de produção de  $H_2O_2$  corresponderia a uma resposta biológica mais específica, tal como descrito para as interações incompatíveis (Baker & Orlandi, 1995; Lamb & Dixon, 1997). No entanto, enquanto que em interações incompatíveis esta segunda fase de produção de  $H_2O_2$  é normalmente acompanhada pelo aparecimento de resposta hipersensível, na interação *C. sativa* - *H. fasciculare*, tal situação não se verificou.

De acordo com o mecanismo não-hospedeiro, que constitui um modelo explicativo da resistência de uma população de hospedeiros a uma população de patógenos, a ocorrência de resposta hipersensível permite distinguir dois tipos de resistência: Tipo I e Tipo II (Mysore & Ryu, 2004). Na resistência de Tipo I, a planta não desenvolve sintomas visíveis de HR, encontrando-se a resistência de Tipo II sempre associada ao desenvolvimento rápido e localizado de resposta hipersensível. No Tipo I de resistência não-hospedeiro, a ausência de morte celular deve-se ao facto do patógeno não conseguir penetrar e multiplicar-se nas células da planta, devido à sua incapacidade em ultrapassar os mecanismos de defesa passivos e activos despoletados na planta (Mysore & Ryu, 2004; Reignault & Sancholle, 2005). Sendo assim, dada a existência de dois picos de produção de  $H_2O_2$  e a ausência de lesões vulgarmente associadas à resposta hipersensível, as plântulas de castanheiro parecem evidenciar uma resposta ao *H. fasciculare* semelhante à descrita para o Tipo I. Contudo, esta reacção tem sido variável consoante as espécies interactuantes, uma vez que plântulas de *Pinus sylvestris* inoculadas com os fungos saprófitas *Phlebiopsis gigantea* e *Marasmius androsaceus* desenvolveram lesões necróticas nas células radiculares (Asiegbu *et al.*, 1999). Foi ainda verificado que o fungo *P. gigantea*, ao contrário de *M. androsaceus*, penetrava até ao sistema vascular da planta provocando a sua morte.

Apesar de uma resposta de defesa da planta de castanheiro à inoculação de *H. fasciculare* ser evidente nas primeiras 48 horas de contacto entre as raízes e fungo, foi notório o aparecimento de danos no sistema vascular das raízes ao fim de 60 dias de eliciação. O fungo *H. fasciculare* parece conseguir ultrapassar as barreiras estruturais e/ou químicas resultantes da activação rápida dos mecanismos de defesa. A monitorização da resposta de defesa despoletada nas plântulas de castanheiro face à eliciação com *H. fasciculare* para tempos superiores a 48 horas permitirá, no futuro, compreender melhor esta questão.

No sistema estabelecido entre *C. sativa* e o fungo *H. fasciculare* verificou-se que, para além do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ocorreu produção de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> durante as primeiras 7 horas de interacção, tendo sido possível detectar dois picos de produção. Após uma fase inicial de detecção transiente de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> às 0,5-1 hora, foi detectada uma maior produção desta espécie reactiva às 5-7 horas após inoculação. A semelhança no padrão de produção de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, até às 7 h de contacto *C. sativa* - *H. fasciculare* (correspondente ao período avaliado quanto à geração de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), sugere que ambas as espécies reactivas estão a ser geradas por vias interdependentes, à semelhança do verificado para a interacção *C. sativa* - *P. tinctorius* e para diversas interacções incompatíveis planta-patogéneo (Lamb & Dixon, 1997). Tal como referido para a interacção *C. sativa* - *P. tinctorius*, no primeiro pico, a produção de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> parece ocorrer ao nível da parede e/ou membrana celular das células das raízes de castanheiro, o que é um aspecto característico associado ao ataque por patogéneos (Neill *et al.*, 2002; Apel & Hirt, 2004). A produção de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, associada ao segundo pico, parece ocorrer no interior das células radiculares, sugerindo o envolvimento de vias de produção de ROS localizadas intracelularmente (Neill *et al.*, 2002; Apel & Hirt, 2004).

Tem sido referido a acção sincronizada de várias enzimas antioxidantes, das quais se destacam a catalase e a superóxido dismutase, na interacção planta-patogéneo. Esta coordenação contribui para o controlo dos níveis de ROS evitando, assim, possíveis danos celulares decorrentes da sua elevada toxicidade (Lamb & Dixon, 1997; García-Limones *et al.*, 2002; Gayoso *et al.*, 2004). Na interacção estabelecida entre *C. sativa* e o fungo *H. fasciculare* foi estudado o envolvimento da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT), no controlo dos níveis de ROS produzidos durante as primeiras 48 horas de interacção.

No que concerne à SOD verificou-se que o rápido aumento da sua actividade, observado 30 minutos após eliciação com o fungo, era coincidente com o primeiro pico de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este resultado, à semelhança do já referido para a interacção *C. sativa* - *P. tinctorius* e em várias interacções incompatíveis (Mittler, 2002; Apel & Hirt, 2004), sugere a contribuição desta enzima para o aumento temporário dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em raízes de *C. sativa* após inoculação com *H. fasciculare*, como consequência da dismutação do radical superóxido. Adicionalmente, o aumento de actividade da SOD pode constituir uma estratégia para a eliminação dos iões superóxido produzidos durante as primeiras horas de interacção raiz-fungo. Em conformidade com esta última hipótese, verificou-se que o segundo aumento na actividade da SOD, observado ao fim

de 5 horas de interação, não foi coincidente com o segundo pico de produção de  $H_2O_2$ , apenas registado às 7 horas após a inoculação. Este resultado sugere um outro mecanismo para a produção de  $H_2O_2$  para além da actividade da SOD, tal como foi evidenciado em algumas interações incompatíveis (Able *et al.*, 2000; Mittler, 2002). De facto, apesar da maioria do  $H_2O_2$  presente nas células das plantas ter origem a partir da actividade da SOD, esta espécie reactiva pode igualmente ser produzida por outros mecanismos enzimáticos ou não-enzimáticos (Foyer *et al.*, 1997; Blokhina *et al.*, 2003).

A diminuição dos níveis de  $H_2O_2$ , observada após 5 horas de interação *C. sativa* – *H. fasciculare*, foi coincidente com o aumento da actividade da SOD e da CAT. Este resultado sugere uma maior capacidade de decomposição do  $H_2O_2$  relativamente à actividade da SOD na geração de  $H_2O_2$ . A activação temporária da CAT poderá desempenhar um papel importante na protecção contra o aumento da produção ROS, evitando possíveis danos celulares (morte celular). A subsequente diminuição da actividade da CAT, registada ao fim de 7 horas de inoculação, coincidente com o aumento dos níveis de  $H_2O_2$ , corrobora a hipótese de possuir um papel no controlo dos níveis de  $H_2O_2$  em raízes de *C. sativa*. O envolvimento da CAT na regulação dos níveis celulares de  $H_2O_2$ , durante as fases iniciais da interação incompatível planta-patogéneo, foi já sugerido por alguns investigadores (Schwacke & Hager, 1992).

A acção sincronizada da SOD e da CAT parece assim contribuir para o controlo dos níveis de  $O_2^{\cdot-}$  e de  $H_2O_2$ , que se formam durante as primeiras 48 horas de interação entre plântulas de *C. sativa* e o fungo *H. fasciculare*, evitando por um lado que os níveis se tornem nocivos para o sistema e por outro lado que constituam sinais específicos na indução de respostas adaptativas da planta ao stresse biótico imposto.



## **CAPÍTULO 6**

### **Conclusões e Perspectivas Futuras**



No decurso do presente trabalho, foi observado que na região transmontana associada à cultura do castanheiro, existe uma flora micológica diversificada, tendo sido registadas 73 espécies, pertencentes a 16 famílias e 23 géneros. Os géneros mais representados foram *Russula*, *Inocybe*, *Lactarius*, *Tricholoma*, *Boletus*, *Cortinarius* e *Amanita*. No decurso deste estudo verificou-se a existência de 31 novos registos associados à cultura de *C. sativa* na região transmontana. A elevada predominância das espécies micorrízicas, que perfazem 82% do total das espécies colhidas, sugere que o souto estudado se encontra em bom estado de conservação. Cerca de 63% do total de espécies identificadas são comestíveis, apresentando algumas delas elevado valor comercial. As espécies macrofúngicas mais abundantes, no total dos quatro anos, foram *L. laccata*, *H. crustuliniforme* e *I. geophylla*; tendo sido estas duas últimas também as mais frequentes. A colheita de todos os macrofungos correspondeu a uma produção total de 67,6 kg ps/ha, tendo sido *L. piperatus*, *R. delica* e *B. edulis* as espécies mais produtoras. Quase metade do total das espécies inventariadas ocorreu somente num dos anos estudados, sobretudo espécies dos géneros *Amanita*, *Boletus*, *Lactarius* e *Tricholoma*; apresentando apenas 4% de ocorrência, no total dos quatro anos. Foram registadas duas épocas de frutificação, uma no Outono (entre o início de Setembro e o fim de Novembro) e outra na Primavera (entre finais de Maio e fim de Junho), sendo a primeira aquela onde se observou um maior número de espécies e de carpóforos. Foi também na época de frutificação do Outono onde se observou o maior número de espécies exclusivas de uma dada época, perfazendo 85% do total das espécies inventariadas, algumas das quais pertencentes aos géneros *Amanita*, *Cortinarius*, *Inocybe* e *Tricholoma*. O decréscimo do número de espécies, de carpóforos e de produção macrofúngica registado ao longo dos anos parece estar relacionado com as variações da precipitação, e em menor extensão da temperatura. A precipitação mostrou ter um efeito positivo na frutificação, muito evidente nos 3 e 30 dias que antecedem a colheita de espécies não micorrízicas e micorrízicas, respectivamente. A temperatura mostrou possuir um efeito inibitório na frutificação, nos 3 dias que antecedem a colheita. Pressupõe-se que o número de espécies macrofúngicas existentes neste souto seja maior, uma vez que se registou apenas 80,5% do total de espécies previsivelmente existente. É igualmente indispensável a sensibilização das populações sobre a

importância dos macrofungos, do seu papel fundamental na ecologia e o seu lugar de destaque na esfera económica, e investir na formação de técnicos especializados na área dos macrofungos. A implementação destas medidas contribuirá para a conservação e uma boa gestão do património micológico transmontano e nacional.

De entre a comunidade macrofúngica associada ao souto estudado, encontrava-se a espécie ectomicorrízica *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch e a espécie saprófita *Hypholoma fasciculare* (Huds.) P. Kumm. Recorrendo ao método da cultura dupla em meio de cultura, verificou-se que o fungo *H. fasciculare* exibia uma acção antagonista sobre o fungo *P. tinctorius*, evidenciada pela redução do crescimento e pela indução de alterações morfológicas nas colónias e nas hifas de *P. tinctorius*. Os mecanismos antagonistas adoptados pelo *H. fasciculare* foram “antagonismo à distância”, observado nos primeiros 20 dias de interacção; e “interferência de hifas”, nos estádios mais avançados, após ocorrência de contacto físico entre as colónias fúngicas interactuantes. Por sua vez, a espécie *P. tinctorius* parece responder à acção antagonista pela formação de um micélio mais compacto e com menor crescimento aéreo, possivelmente como forma de tornar a colónia mais resistente à invasão do *H. fasciculare*. Este mecanismo parece ocorrer como resposta à presença de um composto exsudado por *H. fasciculare*. Adicionalmente, foi verificada a deposição de cristais de oxalato de cálcio na superfície das hifas de *P. tinctorius*. Muito provavelmente, estes cristais resultam da precipitação do cálcio do meio de cultura pela produção de ácido oxálico por *P. tinctorius* em resposta ao antagonismo evidenciado por *H. fasciculare*.

Os resultados apresentados constituem uma primeira abordagem ao estudo da interacção entre fungos saprófitas-lenhícolas e ectomicorrízicos, sendo necessário a realização de trabalhos futuros que permitam a elucidação da natureza dos metabolitos envolvidos nos mecanismos de interacção, assim como do mecanismo de produção de cristais de cálcio e da sua função. Estes estudos deverão ser complementados com a realização de ensaios em condições naturais (campo) para que se possa compreender melhor a ecofisiologia destes microrganismos na rizosfera do castanheiro e, conseqüentemente, o seu efeito na produtividade desta espécie com grande importância sócio-económica.

A inoculação de plântulas de *C. sativa* com o fungo ectomicorrízico *P. tinctorius* ou com o fungo saprófita-lenhícola *H. fasciculare*, em condições de hidroponia,

desencadeou uma série de modificações bioquímicas, vulgarmente associadas à resposta de defesa a agentes patogénicos. Uma das reacções de defesa, observada nas primeiras 48 horas de contacto raiz-fungo, foi o designado choque oxidativo, caracterizado pela produção de espécies reactivas de oxigénio ( $H_2O_2$  e  $O_2^{\cdot-}$ ). As alterações na produção de ROS nas raízes de castanheiro, parecem resultar da acção coordenada entre as diferentes vias de produção e decomposição de ROS, nomeadamente da acção da SOD e da CAT, descritas como estando envolvidas no processo de resistência de plantas a agentes patogénicos.

Nas primeiras 48 horas de interacção raiz-fungo, as plântulas de castanheiro parecem exibir uma resposta de defesa muito semelhante quando eliciadas com o fungo ectomicorrízico ou com o fungo saprófita-lenhícola. Contudo, a partir das 48 horas após a inoculação os mecanismos subjacentes à defesa parecem distinguir-se em função do tipo de interacção, surgindo respostas diferentes consoante a espécie fúngica analisada. Na interacção estabelecida entre *C. sativa* - *P. tinctorius*, a indução da resposta de defesa nas plântulas de castanheiro parece ser insuficiente ou suprimida (pelo próprio fungo e/ou pela planta), de forma a ocorrer a invasão do fungo para a formação de estruturas ectomicorrízicas, com efeitos benéficos para ambos os simbiosites (Martins, 2004). Pelo contrário, na interacção *C. sativa* - *H. fasciculare* foram observados efeitos deletérios para as plântulas, as quais apresentavam, após 60 dias de eliciação, modificações morfológicas ao nível das raízes (obstrução dos vasos xilémicos) acompanhado pelo aparecimento de sintomas de deficiência em água na planta. O aparecimento destas lesões sugere que as plântulas possivelmente não conseguiram estabelecer um mecanismo efectivo de defesa contra os efeitos do fungo *H. fasciculare*. Uma outra hipótese reside no facto das modificações estruturais observadas no sistema vascular das plântulas constituírem uma resposta de defesa, induzida nos estádios mais avançados da interacção *C. sativa* - *H. fasciculare*. Esta hipótese carece, no entanto, de confirmação uma vez que não foi observada a invasão dos tecidos radiculares pelo micélio de *H. fasciculare*. O estudo dos mecanismos bioquímicos e moleculares subjacentes à defesa para tempos superiores a 48 horas de interacção raiz-fungo permitirá, no futuro, elucidar melhor esta questão.

Os resultados observados na interacção *C. sativa* - *P. tinctorius* fornecem ainda evidências que sugerem a capacidade de extractos de raízes de castanheiro, nos estádios iniciais de contacto com *P. tinctorius*, regularem o crescimento do fungo micorrízico.

Nos primeiros 8 dias de cultura de *P. tinctorius*, na presença de extractos proteicos radiculares de *C. sativa* eliciados com *P. tinctorius*, foi verificada a inibição do crescimento do fungo, sobretudo ao fim de 3 a 9 e 15 horas. Esta inibição poderá ter resultado da síntese de alguns compostos pela planta, decorrentes da inoculação com *P. tinctorius*, que reduzem o crescimento de um micélio diferente daquele que iniciou o processo de micorrização. Esta hipótese, apesar de carecer de confirmação, sugere que a planta, após o reconhecimento de um determinado fungo compatível favorece o seu crescimento em detrimento de outros, promovendo, desta forma, o desenvolvimento da simbiose ectomicorrízica. Dado que o efeito inibitório só foi registado após 3 horas de eliciação, esse período poderá corresponder ao tempo necessário para a percepção, transdução de sinal e expressão de genes envolvidos na regulação do crescimento do fungo. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> parece ainda constituir um importante produto inicial da interacção entre *C. sativa* e *P. tinctorius* e uma potencial molécula sinalizadora na regulação do desenvolvimento ectomicorrízico. A partir dos 14 dias de cultura de *P. tinctorius*, o efeito inibitório foi suprimido, sendo notório um estímulo no crescimento de *P. tinctorius*, o qual poderá ter resultado da degradação e/ou da inactivação dos compostos atrás referidos por parte do fungo cultivado.

Na interacção *C. sativa* - *H. fasciculare* verificou-se uma forte adesão das hifas fúngicas à superfície radicular das plântulas, que poderá estar associada à produção de hidrofobinas pelo fungo. A identificação de uma sequência nucleotídica, por amplificação de DNA genómico de *H. fasciculare*, de uma putativa hidrofobina de classe I, reforça, em parte, o envolvimento deste tipo de proteínas na adesão do fungo a raízes de castanheiro. Contudo, apenas a análise de expressão deste gene no decorrer do processo de infecção de raízes de castanheiro com o fungo *H. fasciculare* permitirá elucidar o seu envolvimento no processo de adesão fungo-raiz. O reconhecido papel de das hidrofobinas no processo da patogenicidade, a indução de mecanismos de defesa em plântulas de castanheiro, bem como o aparecimento de lesões nas plântulas de castanheiro após inoculação com *H. fasciculare*, levam a supor que este fungo possa ser um agente infeccioso. Apesar de preliminares, estes resultados revestem-se de interesse uma vez que quantidades não negligenciáveis de carpóforos de *H. fasciculare* foram registados em soutos saudáveis, podendo vir a exercer um efeito nefasto para a cultura do castanheiro. Adicionalmente, o efeito antagonista do *H. fasciculare* sobre *P. tinctorius* pode (i) alterar a composição, a dimensão e funcionamento da comunidade

fúngica existente no solo, nomeadamente ao nível da translocação de nutrientes, com efeitos na sanidade e no crescimento das plantas e (ii) comprometer a micorrização das plantas de castanheiro e as vantagens que daí advém (Martins, 2004). Contudo, convém referir que a interpretação dos resultados e a sua extrapolação para o campo devem ser efectuadas com cautela, dado que estes estudos foram efectuados em condições estéreis, não reflectindo as condições naturais onde os diferentes organismos interactuam. Este aspecto reveste-se de importância uma vez que a resposta da planta depende, para além das características do agente patogénico e do hospedeiro, dos factores ambientais (Reignault & Sancholle, 2005). A resposta de defesa da planta, depende também de um grande número de variáveis, incluindo a idade e estágio de desenvolvimento da planta (Mehdy *et al.*, 1996). Sendo assim, é recomendável que a infecção de plantas de castanheiro por *H. fasciculare* seja estudada por ensaios realizados em condições naturais de campo, utilizando plantas em diferentes estádios de desenvolvimento.



## **ANEXOS**



## ANEXO I

Espécies macrofúngicas associadas a soutos e castiçais na região transmontana anteriormente referenciadas

<b>Família, género e espécies</b>	<b>Trofia</b>	<b>Comest</b>	<b>Referência</b>
<b>Bolbitiaceae</b>			
<i>Agrocybe</i>			
<i>A. aegirita</i> (V. Brig.) Quél.	s	C	1
<i>Hebeloma</i>			
<i>H. crustuliniforme</i> (Bull.) Quél.	m	NC	1
<i>H. fusipes</i> Bres.	m	NC	1
<i>H. radicosum</i> (Bull.) Ricken	m	C	2
<b>Pluteaceae</b>			
<i>Amanita</i>			
<i>A. caesarea</i> (Scop.) Pers.	m	C	2
<i>A. citrina</i> (Schaeff.) Pers.	m	NC	1, 2, 4
<i>A. gemmata</i> (Fr.) Bertill.	m	NC	1, 3, 4
<i>A. muscaria</i> (L.) Lam.	m	NC	1, 2, 3
<i>A. pantherina</i> Gonn. & Rabenh.	m	NC	1, 2, 4
<i>A. phalloides</i> (Vaill. Ex Fr.) Link	m	NC	2
<i>A. rubescens</i> Pers.	m	C	1, 2, 3, 4
<i>A. spissa</i> (Fr.) P. Kumm.	m	C	1, 3, 4
<i>A. vaginata</i> (Bull.) Lam.	m	C	1, 2, 4
<i>A. vittadini</i> (Moretti) Sacc.	m	NC	4
<b>Marasmiaceae</b>			
<i>Armillaria</i>			
<i>A. mellea</i> (Vahl) P. Kumm.	p	C	2
<i>Marasmius</i>			
<i>M. androsaceus</i> (L.) Fr.	s	NC	1
<i>M. oreades</i> (Bolton) Fr.	s	C	2
<i>M. quercophilus</i> Pouzar	s	NC	1
<i>Oudemansiella</i>			
<i>O. radicata</i> (Relhan) Singer	s	C	1, 2
<b>Astraeaceae</b>			
<i>Astraeus</i>			
<i>A. hygrometricus</i> (Pers.) Morgan	s	NC	3
<b>Auriculariaceae</b>			
<i>Auricularia</i>			
<i>A. auricula-judae</i> (Fr.) Quél.	s	C	2
<b>Boletaceae</b>			
<i>Boletus</i>			
<i>B. aestivalis</i> (Paulet) Fr.	m	C	1
<i>B. appendiculatus</i> Schaeff.	m	C	4
<i>B. calopus</i> Pers.	m	NC	1, 2
<i>B. edulis</i> Bull.	m	C	1, 2, 3, 4
<i>B. erythropus</i> Pers.	m	C	1, 2, 3, 4
<i>B. lividus</i> Rostk.	m	C	3
<i>B. luridus</i> Schaeff.	m	C	1
<i>B. piperatus</i> Sowerby	m	NC	2
<i>B. queletii</i> Schulzer	m	C	1, 3
<i>B. subtomentosus</i> L. (= <i>Xerocomus subtomentosus</i> (L.) Fr.)	m	C	1, 2, 3, 4
<i>Xerocomus</i>			
<i>X. badius</i> (Fr.) Kühner	m	C	2, 3
<i>X. chrysenteron</i> (Bull.) Quél.	m	C	1, 4
<b>Lycoperdaceae</b>			
<i>Bovista</i>			
<i>B. plumbea</i> Pers.	s	NC	1
<i>Lycoperdon</i>			
<i>L. foetidum</i> Bonord.	s	C	3
<i>L. molle</i> Pers.	s	NC	1, 3

## Espécies macrofúngicas associadas a soutos e castinçais na região transmontana anteriormente referenciadas (cont.)

<b>Família, género e espécies</b>	<b>Trofia</b>	<b>Comest</b>	<b>Referência</b>
<i>L. perlatum</i> Pers.	s	C	1, 2, 3, 4
<i>L. pyriforme</i> Schaeff.	s	C	2, 3
<i>Vascellum</i>			
<i>V. pratense</i> (Pers.) Kreisel	s	C	1
<b>Cantharellaceae</b>			
<i>Cantharellus</i>			
<i>C. cibarius</i> Fr.	m	C	1, 2, 3, 4
<i>C. cinereus</i> Pers.	m	C	1, 2
<i>C. lutescens</i> (Pers.) Fr.	m	C	1
<i>C. tubaeformis</i> (Bull.) Fr.	m	C	1, 2
<b>Clavulinaceae</b>			
<i>Clavulina</i>			
<i>C. rugosa</i> (Bull.) J. Schröt.	s	C	1
<b>Tricholomataceae</b>			
<i>Clitocybe</i>			
<i>C. alexandri</i> (Gillet) Konrad	s	C	3
<i>C. candicans</i> (Pers.) P. Kumm.	s	NC	1
<i>C. cyathiformis</i> (Bull.) P. Kumm.	s	C	1
<i>C. gibba</i> (Pers.) P. Kumm.	s	C	1, 2
<i>C. metachroa</i> (Fr.) P. Kumm.	s	NC	2
<i>C. odora</i> (Bull.) P. Kumm.	s	C	2, 3
<i>C. suaveolens</i> (Schumach.) P. Kumm.	s	C	2
<i>C. subalutacea</i> (Batsch) P. Kumm.	s		1
<i>Collybia</i>			
<i>C. butyracea</i> (Bull.) Fr.	s	C	2
<i>C. dryophila</i> (Bull.) P. Kumm.	s	C	1, 2
<i>C. extuberans</i> (Fr.) Quél.	s	?	1, 2
<i>C. fusipes</i> (Bull.) Quél.	s	C	1, 2
<i>C. maculata</i> (Alb. & Schwein.) P. Kumm.	s	C	1, 2
<i>C. succinea</i> (Fr.) Quél.	s	NC	1
<i>Lepista</i>			
<i>L. nuda</i> (Bull.) Cooke	s	C	1, 2, 3
<i>Mycena</i>			
<i>M. alcalina</i> (Fr.) P. Kumm.	s	NC	2
<i>M. epipterygia</i> (Scop.) Gray	s	NC	2
<i>M. galericulata</i> (Scop.) Gray	s	C	1
<i>M. inclinata</i> (Fr.) Quél.	s	C	2
<i>M. pura</i> (Pers.) P. Kumm.	s	C	2
<i>Myxomphalia</i>			
<i>M. invita</i> (P. Karst.) M.M. Moser	s	?	1
<i>Pseudoclitocybe</i>			
<i>P. obbata</i> (Fr.) Singer	s	C	1
<i>Tricholoma</i>			
<i>T. album</i> (Schaeff.) P. Kumm.	m	NC	2
<i>T. aurantium</i> (Schaeff.) Ricken	m	C	2
<i>T. columbetta</i> (Fr.) P. Kumm.	m	C	2
<i>T. inodermeum</i> (Fr.) Gillet	m	NC	1
<i>T. luridum</i> (Schaeff.) P. Kumm.	m	C	3
<i>T. pardinum</i> Quél.	m	NC	2
<i>T. portentosum</i> (Fr.) Quél.	m	C	1, 2, 3
<i>T. saponaceum</i> (Fr.) P. Kumm.	m	C	3
<i>T. sulphureum</i> (Bull.) P. Kumm.	m	NC	1
<i>T. ustaloides</i> Romagn.	m	C	1
<i>T. vaccinum</i> (Schaeff.) P. Kumm.	m	NC	2
<i>T. virgatum</i> (Fr.) P. Kumm.	m	NC	2

## Espécies macrofúngicas associadas a soutos e castiçais na região transmontana anteriormente referênciadas (cont.)

<b>Família, género e espécies</b>	<b>Trofia</b>	<b>Comest</b>	<b>Referência</b>
<b>Entolomataceae</b>			
<i>Clitopilus</i>			
<i>C. prunulus</i> (Scop.) P. Kumm.	m	C	1, 3
<i>Entoloma</i>			
<i>E. ameides</i> (Berk. & Broome) Sacc.	s	C	1
<i>E. eximium</i> (Romagn.) Noordel.	s	?	1
<i>E. nidorosum</i> (Fr.) Quél.	s	NC	2
<i>E. papillatum</i> (Bres.) Dennis	s	NC	1
<i>E. sordidulum</i> (Kühner & Romagn.) P.D. Orton	s	NC	1
<b>Cortinariaceae</b>			
<i>Cortinarius</i>			
<i>C. alboviolaceus</i> (Pers.) Fr.	m	NC	1
<i>C. arvinaceus</i> Fr.	m	NC	1
<i>C. elatior</i> Fr.	m	C	2
<i>C. glaucopus</i> (Schaeff.) Fr.	m	C	1
<i>C. multiformis</i> (Fr.) Fr.	m	C	2
<i>C. odorifer</i> Britzelm.	m	NC	2
<i>C. orellanus</i> Fr.	m	NC	2
<i>C. purpurascens</i> (Fr.) Fr.	m	C	2
<i>C. saniosus</i> (Fr.) Fr.	m	NC	1
<i>C. saturninus</i> (Fr.) Fr.	m	NC	2
<i>C. semisanguineus</i> (Fr.) Gillet	m	NC	1, 2
<i>C. speciosissimus</i> Kühner & Romagn.	m	NC	2
<i>C. strobilaceus</i> M.M. Moser	m	NC	1
<i>C. torvus</i> (Fr.) Fr.	m	NC	2
<i>C. trivialis</i> J.E. Lange	m	C	1, 2
<i>C. variicolor</i> (Pers.) Fr.	m	C	2
<i>C. versicolor</i> A. Blytt	m	NC	2
<i>C. viscidulus</i> M.M. Moser	m	NC	1
<i>Crepidotus</i>			
<i>C. herbarum</i> (Peck) Sacc.	s	?	1
<i>C. mollis</i> (Schaeff.) Staude	s	C	1
<i>Flammulaster</i>			
<i>F. gracilis</i> (Quél.) Watling	s	NC	1
<i>F. rhombospora</i> (G.F. Atk.) Watling	s	NC	1
<i>Inocybe</i>			
<i>I. brevispora</i> Huijsman	m	NC	1
<i>I. geophylla</i> (Pers.) P. Kumm.	m	NC	1
<i>Phaeomarasmius</i>			
<i>P. erinaceus</i> (Pers.) Scherff. ex Romagn.	s	NC	1
<b>Nidulariaceae</b>			
<i>Crucibulum</i>			
<i>C. laeve</i> (Huds.) Kambly	s	NC	1
<b>Fistulinaceae</b>			
<i>Fistulina</i>			
<i>F. hepatica</i>	s(p?)	C	1, 2
<b>Ganodermataceae</b>			
<i>Ganoderma</i>			
<i>G. lucidum</i> (Curtis) P. Karst.	p	NC	1
<b>Helvellaceae</b>			
<i>Helvella</i>			
<i>H. acetabulum</i> (L.) Quél.	s	C	1
<i>H. lacunosa</i> Afzel.	s	C	1, 4
<b>Pyronemataceae</b>			
<i>Humaria</i>			
<i>H. hemisphaerica</i> (F.H. Wigg.) Fuckel	s	NC	2

## Espécies macrofúngicas associadas a soutos e castinçais na região transmontana anteriormente referenciadas (cont.)

Família, género e espécies	Trofia	Comest	Referência
<b>Hydnaceae</b>			
<i>Hydnum</i>			
<i>H. repandum</i> L.	m	C	2, 3
<i>H. rufescens</i> Pers.	m	C	1
<b>Hygrophoropsidaceae</b>			
<i>Hygrophoropsis</i>			
<i>H. aurantiaca</i> (Wulfen) Maire	s	C	2, 3
<b>Hygrophoraceae</b>			
<i>Hygrophorus</i>			
<i>H. arbustivus</i> Fr.	m	C	1
<i>H. discoideus</i> (Pers.) Fr.	m	C	3
<i>H. purpurascens</i> Gonn. & Rabenh.	m	C	1
<i>H. virgineus</i> (Wulfen) Fr.	m	C	2
<b>Strophariaceae</b>			
<i>Hypholoma</i>			
<i>H. fasciculare</i> (Huds.) P. Kumm.	s(p?)	NC	1, 2, 3
<i>Psilocybe</i>			
<i>P. semilanceata</i> (Fr.) P. Kumm.	s	NC	1
<b>Hydnangiaceae</b>			
<i>Laccaria</i>			
<i>L. amethystina</i> Cooke	m	C	1, 2, 4
<i>L. laccata</i> (Scop.) Fr.	m	C	1, 2, 4
<i>L. montana</i> Singer	m	?	1
<i>L. proxima</i> (Boud.) Pat.	m	C	1
<b>Russulaceae</b>			
<i>Lactarius</i>			
<i>L. acris</i> (Bolton) Gray	m	NC	1
<i>L. chrysorrheus</i> Fr.	m	NC	1, 2
<i>L. mitissimus</i> (Fr.) Fr.	m	NC	1
<i>L. obscuratus</i> (Lasch) Fr.	m	NC	1
<i>L. pallidus</i> Pers.	m	NC	2
<i>L. piperatus</i> (L.) Pers.	m	C	1, 4
<i>L. quietus</i> (Fr.) Fr.	m	C	3
<i>L. rufus</i> (Scop.) Fr.	m	NC	3
<i>L. subdulcis</i> (Bull.) Gray	m	C	2
<i>L. torminosus</i> (Schaeff.) Gray	m	NC	2
<i>L. uvidus</i> (Fr.) Fr.	m	NC	1, 2
<i>L. vellereus</i> (Fr.) Fr.	m	NC	1, 2, 4
<i>L. volemus</i> (Fr.) Fr.	m	C	1
<i>Russula</i>			
<i>R. aeruginea</i> Fr.	m	C	1
<i>R. amoenicolor</i> Romagn.	m	C	4
<i>R. atropurpurea</i> Krombh.) Britzelm.	m	NC	3
<i>R. aurata</i> (With.) Fr.	m	C	1
<i>R. claroflava</i> Grove	m	C	1
<i>R. cyanoxantha</i> (Schaeff.) Fr.	m	C	1, 2, 3, 4
<i>R. delica</i> Fr.	m	C	1, 2, 4
<i>R. fellea</i> (Fr.) Fr.	m	NC	1
<i>R. fragilis</i> Fr.	m	NC	1, 3
<i>R. laurocerasi</i> Melzer	m	NC	1
<i>R. lutea</i> Vent.	m	C	1
<i>R. minutula</i> Velen.	m	C	4
<i>R. nigricans</i> (Bull.) Fr.	m	C	1
<i>R. ochroleuca</i> (Pers.) Fr.	m	C	2, 4
<i>R. puellaris</i> Fr.	m	C	1
<i>R. risigallina</i> (Batsch) Sacc.	m	C	4

## Espécies macrofúngicas associadas a soutos e castiçais na região transmontana anteriormente referenciadas (cont.)

<b>Família, género e espécies</b>	<b>Trofia</b>	<b>Comest</b>	<b>Referência</b>
<i>R. roseipes</i> Secr. Ex Bres.	m	C	4
<i>R. vesca</i> Fr.	m	C	1, 2
<i>R. violacea</i> Quél.	m	NC	4
<i>R. virescens</i> (Schaeff.) Fr.	m	C	4
<b>Physaraceae</b>			
<i>Leocarpus</i>			
<i>L. fragilis</i> (Dicks.) Rostaf.	s	NC	1
<b>Leotiaceae</b>			
<i>Leotia</i>			
<i>L. lubrica</i>	s	C	1, 2
<b>Agaricaceae</b>			
<i>Macrolepiota</i>			
<i>M. procera</i> (Scop.) Singer	s	C	2
<b>Paxillaceae</b>			
<i>Paxillus</i>			
<i>P. involutus</i> (Batsch) Fr.	m	NC	1, 2, 3
<b>Pezizaceae</b>			
<i>Peziza</i>			
<i>P. cerea</i> Sowerby	s	NC	1
<b>Sclerodermataceae</b>			
<i>Pisolithus</i>			
<i>P. tinctorius</i> (Pers.) Coker & Couch	m	C	3
<i>Scleroderma</i>			
<i>S. citrinum</i> Pers.	m	NC	2, 3
<i>S. polyrhizum</i> (J.F. Gmel.) Pers.	m	NC	3
<b>Fomitopsidaceae</b>			
<i>Postia</i>			
<i>P. caesia</i> (Schrad.) P. Karst.	s	NC	1
<b>Ramariaceae</b>			
<i>Ramaria</i>			
<i>R. formosa</i> (Pers.) Quél.	m	NC	1, 2, 4
<b>Rutstroemiaceae</b>			
<i>Rutstroemia</i>			
<i>R. echinophila</i> (Bull.) Höhn.	s	NC	1

Referências: [1] Azevedo (1989); [2] Menezes (1990); [3] Meireles (1997); [4] Borges (1998).

Legenda: Comest. – comestibilidade; C – comestível; NC – não comestível; m – micorrizico; s – saprófita; p – parasita; ? – desconhecido.



## ANEXO II

Números de acesso das sequências nucleotídicas de regiões ITS do rDNA (ITS1, 5,8S e ITS2) de diferentes espécies fúngicas referidas neste trabalho

<b>Espécie</b>	<b>Número de acesso</b>
<b>Basidiomicetos</b>	
<i>Agaricus bisporus</i>	DQ404388
<i>Amanita muscaria</i>	DQ060910
<i>Boletus aereus</i>	DQ131620
<i>Clitocybe nebularis</i>	AF357063
<i>Clitopilus prunulus</i>	DQ202272
<i>Collybia butyracea</i>	AY781251
<i>Cortinarius diasemospermus</i>	AM087247
<i>Hebeloma crustuliniforme</i>	AF124716
<i>Hydnum rufescens</i>	AM087246
<i>Hypholoma fasciculare</i>	DQ320134
<i>Inocybe geophylla</i>	DQ093854
<i>Laccaria laccata</i>	AJ699075
<i>Lactarius deliciosus</i>	DQ116886
<i>Lentinula edodes</i>	AY683195
<i>Lycoperdon perlatum</i>	DQ112630
<i>Macrolepiota procera</i>	AF482848
<i>Paxillus involutus</i>	AM084700
<i>Pholiota nameko</i>	AY251304
<i>Pisolithus tinctorius</i>	AF374707
<i>Pleurotus ostreatus</i>	DQ077884
<i>Polyporus squamosus</i>	AF516591
<i>Russula cyanoxantha</i>	AM087258
<i>Scleroderma bovista</i>	AB211267
<i>Tricholoma acerbum</i>	AF377247
<i>Xerocomus subtomentosus</i>	DQ066413
<b>Ascomicetos</b>	
<i>Morchella conica</i>	DQ257345
<i>Peziza succosella</i>	DQ200841
<i>Terfezia arenaria</i>	AF276674
<i>Tuber melanosporum</i>	DQ388877



## ANEXO III

Números de acesso das sequências nucleotídicas e aminoacídicas de hidrofobinas referidas neste trabalho

Espécie	Número de acesso	Gene	
		Designação original	Designação atribuída
<b>Basidiomicetos</b>			
<i>Agaricus bisporus</i>	AJ293763	<i>h-81</i>	<i>Hyd1</i>
<i>Agaricus bisporus</i>	AJ293764	<i>h-146</i>	<i>Hyd2</i>
<i>Agaricus bisporus</i>	Y15941	<i>hydrophobin HYPB</i>	<i>Hyd3</i>
<i>Agaricus bisporus</i>	X89242	<i>hypA</i>	<i>Hyd4</i>
<i>Dictyonema glabratum</i>	AJ320544	<i>h1</i>	<i>Hyd1</i>
<i>Dictyonema glabratum</i>	AJ320545	<i>h2</i>	<i>Hyd2</i>
<i>Dictyonema glabratum</i>	AJ320546	<i>h3</i>	<i>Hyd3</i>
<i>Flammulina velutipes</i>	AB026720	<i>fvh1</i>	<i>Hyd</i>
<i>Lentinula edodes</i>	AF176647	<i>Hyd1</i>	<i>Hyd1</i>
<i>Lentinula edodes</i>	AF176648	<i>Hyd2</i>	<i>Hyd2</i>
<i>Paxillus involutus</i>	AY857495	<i>hydA</i>	<i>Hyd</i>
<i>Phlebiopsis gigantea</i>	AY822597	<i>h1</i>	<i>Hyd1</i>
<i>Phlebiopsis gigantea</i>	AY822598	<i>h2</i>	<i>Hyd2</i>
<i>Pholiota nameko</i>	AB079128	<i>hydrophobin-251</i>	<i>Hyd1</i>
<i>Pholiota nameko</i>	AB079129	<i>hydrophobin-263</i>	<i>Hyd2</i>
<i>Pholiota nameko</i>	AB079130	<i>hydrophobin-315</i>	<i>Hyd3</i>
<i>Pleurotus ostreatus</i>	AJ238147	<i>hydrophobin 1</i>	<i>Hyd1</i>
<i>Pleurotus ostreatus</i>	AF331452	<i>hydrophobin</i>	<i>Hyd2</i>
<i>Pleurotus ostreatus</i>	AJ004883	<i>hydrophobin 1</i>	<i>Hyd3</i>
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Y14656	<i>hydrophobin 1</i>	<i>Hyd4</i>
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Y14657	<i>hydrophobin 2</i>	<i>Hyd5</i>
<i>Pleurotus ostreatus</i>	AJ238148	<i>hydrophobin 3</i>	<i>Hyd6</i>
<i>Pisolithus tinctorius</i>	U29605	<i>HydPt-1</i>	<i>Hyd1</i>
<i>Pisolithus tinctorius</i>	U29606	<i>HydPt-2</i>	<i>Hyd2</i>
<i>Pisolithus tinctorius</i>	AF097516	<i>hydPt-3</i>	<i>Hyd3</i>
<b>Ascomicetos</b>			
<i>Aspergillus fumigatus</i>	XM_748588	<i>Hyp1</i>	<i>Hyd1</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	XM_742298	<i>Afu8g05890</i>	<i>Hyd2</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	XM_742411	<i>Afu8g07060</i>	<i>Hyd3</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	XM_748000	<i>Afu1g17250</i>	<i>Hyd4</i>
<i>Aspergillus nidulans</i>	XM_676183	<i>AN8006.2</i>	<i>Hyd</i>
<i>Cladosporium fulvum</i>	AJ133700	<i>hydrophobin 2</i>	<i>Hyd1</i>
<i>Cladosporium fulvum</i>	AJ133701	<i>hydrophobin 3</i>	<i>Hyd2</i>
<i>Cladosporium fulvum</i>	AJ133702	<i>hydrophobin 4</i>	<i>Hyd3</i>
<i>Cladosporium fulvum</i>	AJ133703	<i>hydrophobin 5</i>	<i>Hyd4</i>
<i>Cladosporium herbarum</i>	AJ496190	<i>hch-1</i>	<i>Hyd</i>
<i>Metarhizium anisopliae</i>	M85281	<i>hydrophobin-like protein (ssgA)</i>	<i>Hyd</i>

Números de acesso das sequências nucleotídicas e aminoacídicas de hidrofobinas referidas neste trabalho (cont.)

Espécie	Número de acesso	Gene	
		<i>Designação original</i>	<i>Designação atribuída</i>
<b>Ascomycetos</b>			
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	AY427793	<i>hyd2</i>	<i>Hyd</i>
<i>Xanthoria ectaneoides</i>	AJ250793	<i>hydrophobin H1</i>	<i>Hyd</i>
<i>Xanthoria parietina</i>	AJ250794	<i>hydrophobin H1</i>	<i>Hyd</i>

## **BIBLIOGRAFIA**



- Able AJ, Guest DI, Sutherland MW** (2000) Hydrogen peroxide yields during the incompatible interaction of tobacco suspension cells inoculated with *Phytophthora nicotianae*. *Plant Physiology*, **124**: 899-910.
- Aebi H** (1983) Catalase. In *Enzymes 1: Oxidoreductases, Transferases*. Volume III (HU Bergmeyer, ed) Verlag Chemie, New York, pp. 273-286.
- Aggarwal R, Tewari AK, Srivastava KD, Singh DV** (2004) Role of antibiosis in the biological control of spot blotch (*Cochliobolus sativus*) of wheat by *Chaetomium globosum*. *Mycopathologia*, **157**: 369-377.
- Akasaka H, Shiono Y, Murayama T, Ikeda M** (2005) Fascicularones H-K, four new sesquiterpenoids from the cultured mycelia of the fungus *Hypholoma fasciculare*. *Helvetica Chimica Acta*, **88**: 2944-2950.
- Albrecht C, Asselin A, Piché Y, Lapeyrie F** (1994) Chitinase activities are induced in *Eucalyptus globulus* roots by ectomycorrhizal or pathogenic fungi, during early colonization. *Physiologia Plantarum*, **91**: 104-110.
- Alessio CL** (1985) *Boletus Dill. ex L. Fungi Europaei*. Vol. 2. Libreria Editrice Giovanna Biella, Saronno.
- Allen EB, Allen MF, Helm DJ, Trappe JM, Molina RJ, Rincon E** (1995) Patterns and regulation of mycorrhizal plant and fungal diversity. *Plant and Soil*, **170**: 47-62.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, **25**: 3389-3402.
- Ana-Magán FJF, Fernández AR** (2000) *Os Cogumelos nos Ecosistemas Forestais Galegos*. Edición Xerais de Galicia, S.A.
- Anderson IC, Chambers SM, Cairney JWG** (2001) ITS-RFLP and ITS sequence diversity in *Pisolithus* from central and eastern Australian sclerophyll forests. *Mycological Research*, **105**: 1304-1312.
- Annesi T, Curcio G, D'amico L, Motta E** (2005) Biological control of *Heterobasidion annosum* on *Pinus pinea* by *Phlebiopsis gigantea*. *Forest Pathology*, **35**: 127.
- Anónimo** (1999) *Listagem Preliminar de Fungos Agaricoides de Portugal*. Centro de Micologia da Universidade de Lisboa.
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Biology*, **55**: 373-399.
- Apoga D, Jansson H-B, Tunlid A** (2001) Adhesion of conidia and germlings of the plant pathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana* to solid surfaces. *Mycological Research*, **105**: 1251-1260.
- Arnolds E** (1991) Decline of Ectomycorrhizal Fungi in Europe. *Agriculture Ecosystem & Environment*, **35**: 209-244.
- Arnolds E** (1992) The analysis and classification of fungal communities with special reference to macrofungi. In *Fungi in Vegetation Science*. (W Winterhoff, ed) Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 7-47.
- Arnolds E** (1995) *Problems in Measurements of Species Diversity of Macrofungi*. CAB International, Netherlands.
- Arocena JM, Glowa KR, Massicotte HB** (2001) Calcium-rich hypha encrustations on *Piloderma*. *Mycorrhiza*, **10**: 209-215.
- Asada K** (1999) The water-water cycle in chloroplast: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**: 601-639.
- Asada K, Takahashi M, Nagate M** (1974) Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase. *Agricultural and Biological Chemistry*, **38**: 471-473.
- Ásgeirsdóttir SA, de Vries OMH, Wessels JGH** (1998) Identification of three differentially expressed hydrophobins in *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom). *Microbiology*, **144**: 2961-2969.
- Asiegbu FO, Johansson M, Stenlid J** (1999) Reactions of *Pinus sylvestris* (Scots pine) root tissues to the presence of mutualistic, saprotrophic and necrotrophic micro-organisms. *J. Phytopathology*, **147**: 257-264.
- Azevedo J** (1989) *Inventário de macrofungos em povoamentos de Castanea sativa em Trás-os-Montes*. Relatório Final de Estágio de Licenciatura em Engenharia Florestal. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real.

- Bais H, Park S-W, Weir T, Callaway R, Vivanco J** (2004) How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends Plant Sci*, **9**: 26-32.
- Baker CJ, Orlandi EW** (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, **33**: 299-321.
- Baptista P, Branco S, Martins A** (2003) Preliminary evaluation of edible mushroom biodiversity and production in the Northeast of Portugal. In *3rd International Workshop on Edible Mycorrhizal Mushrooms: Ecology, Physiology and Cultivation*, (Canada (Victoria)).
- Baptista P, Martins A, Lino-Neto T, Tavares RM** (2005) Effect of soil tillage on diversity and abundance of macrofungi associated with chestnut tree in the Northeast of Portugal. *Acta Horticulturae*, **693**: 685-690.
- Bara MTF, Lima AL, Ulhoa CJ** (2003) Purification and characterization of an exo-beta-1, 3-glucanase produced by *Trichoderma aspellum*. *FEMS Microbiology Letters*, **219**: 81-85.
- Barbosa P** (1994) *Inventário de macrofungos em castiçais, pinhais e sobreirais de Trás-os-Montes*. Relatório Final de Estágio de Licenciatura em Engenharia Agrícola. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real.
- Barea JM, Pozo MJ, Azcón R, Azcón-Aguilar C** (2005) Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, **56**: 1761-1778.
- Barker SJ, Tagu D** (2000) The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbioses. *Journal of Plant Growth Regulation*, **19**: 144-154.
- Barker SJ, Tagu D, Delp G** (1998) Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbioses. *Plant Physiology*, **116**: 1201-1207.
- Barros L, Ferreira M-J, Queirós B, Ferreira ICFR, Baptista P** (2007) Total phenols, ascorbic acid, -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, **103**: 412-419.
- Barrote SC** (1998) *Organização de um herbário de macromicetas na Escola Superior Agrária de Bragança*. Relatório Final de Estágio de Licenciatura em Gestão de Recursos Florestais. Escola Superior Agrária de Bragança. Bragança.
- Bas C, Kuyper THW, Noordeloos ME, Vellinga EC** (1990-2001) *Flora Agaricina Neerlandica: Critical Monographs on Families of Agarics and Boleti Occuring in the Netherlands*. Vols. 1-5. A.A Balkema, Rotterdam, Broakfield.
- Béguiristain T, Lapeyrie F** (1997) Host plant stimulates hypaphorine accumulation in *Pisolithus tinctorius* hyphae during ectomycorrhizal infection while excreted fungal hypaphorine controls root hair development. *New Phytologist*, **136**: 525-532.
- Béguiristain T, Côte R, Rubini P, Jay-Allemand C, Lapeyrie F** (1995) Hypaphorine accumulation in the hyphae of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Phytochemistry*, **40**: 1089-1091.
- Beyer WF, Fridovich I** (1987) Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, **161**: 559-566.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV** (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, **91**: 179-194.
- Boddy L** (1993) Saprotrophic cord-forming fungi: meeting the challenge of heterogeneous environments. *Mycologia*, **91**: 13-32.
- Boddy L** (1999) Saprotrophic cord-forming fungi: Meeting the challenge of heterogeneous environments. *Mycologia*, **91**: 13-32.
- Boddy L** (2000) Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS Microbiology Ecology*, **31**: 185-194.
- Bolwell GP, Bindschedler LV, Blee KA, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C, Minibayeva F** (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a tree component system. *Journal of Experimental Botany*, **53**: 1367-1376.
- Bon M** (1988) *Guia de Campo de los Hongos de Europa*. Ediciones Omega, Barcelona.
- Bonfante P, Balestrini R, Martino E, Perotto S, Plassard C, Mousain D** (1998) Morphological analysis of early contacts between pine roots and two ectomycorrhizal *Suillus* strains. *Mycorrhiza*, **8**: 1-10.
- Borchers AT, Keen CL, Gershwin ME** (2004) Mushrooms, Tumors, and Immunity: An Update. *Experimental Biology and Medicine*, **229**: 393-406.

- Borchers AT, Stern JS, Hackman RM, Keen CL, Gershwin ME** (1999) Mushrooms, tumors and immunity. *Experimental Biology and Medicine*, **221**: 281–293.
- Borges MM** (1998) *Diversidade das populações de fungos ectomicorrízicos em povoamentos de Castanea sativa Mill. na região de Trás-os-Montes*. Rel. Final de Licenciatura em Engenharia florestal. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real.
- Bowen GD, Rovira AD** (1999) The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy*, **66**: 1-102.
- Bowler C, Fluhr R** (2000) The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends in Plant Science*, **5**: 241-246.
- Branco S** (2003) *Macrofungos no Parque natural de Montesinho. Estudo preliminar de inventariação e caracterização*. Instituto da Conservação da Natureza.
- Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyl E** (2000) Responses to abiotic stresses. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. (WGeRLJ B. B. Buchanan, ed) American Society of Plant Physiologist, Rockville, pp. 1044-1100.
- Breitenbach J, Kränzlin F** (1984-2000) *Champignons de Suisse*. Vols. 1-5. Mykologia Lucern, Lucern.
- Bremner JM** (1996) N Total. In *Methods of Soil Analysis. Part 3 - Chemical Methods*. Vol 5 (DL Sparks, ed) Soil Science Society of America Book, Madison, WI.
- Brimmer TA, Boland GJ** (2003) A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **100**: 3-16.
- Brown N, Bhagwat S, Watkinson S** (2006) Macrofungal diversity in fragmented and disturbed forests of the Western Ghats of India. *Journal of Applied Ecology*, **43**: 11–17.
- Brundrett M, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N** (1996) *Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture*. ACIAR Monograph No.32. CSIRO Publishing.
- Bruns T, White JA, Taylor JW** (1991) Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **22**: 525-564.
- Bruns TD** (1995) Thoughts on the processes that maintain local species diversity of ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, **170**: 63-73.
- Buscot F, Munch JC, Charcosset JY, Gardes M, Nehls U, Hampp R** (2000) Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, **24**: 601-614.
- Cairney J, Burke R** (1994) Fungal enzymes degrading plant cell walls: their possible significance in the ectomycorrhizal symbiosis. *Mycological Research*, **98**: 1345-1356.
- Cairney JWG, Chambers SM** (1997) Interactions between *Pisolithus tinctorius* and its hosts: a review of current knowledge. *Mycorrhiza*, **7**: 117-131.
- Cairney JWG, Meharg AA** (2002) Interactions between ectomycorrhizal fungi and soil saprotrophs: implications for decomposition of organic matter in soils and degradation of organic pollutants in the rhizosphere. *Canadian Journal of Botany*, **80**: 803-809.
- Calistru C, McLean M, Berjak P** (1997) *In vitro* studies on the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species. *Mycopathologia*, **139**: 115-121.
- Calonge FD** (1983) *Hongos de nuestros campos e bosques*. Instituto Nacional para la Conservación de la Naturaleza, Madrid.
- Candusso M, Lanzoni G** (1990) *Lepiota s.l. Fungi Europaei*. Libreria Editrice Giovanna Biella, Saronno.
- Cano BF** (2002) *Estudo das potencialidades micológicas do concelho de Bragança*. Relatório Final de estágio de Licenciatura em Engenharia Florestal. Escola Superior Agrária de Bragança. Bragança.
- Cano C, Bago A** (2005) Competition and substrate colonization strategies of three polyxenically grown arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia*, **97**: 1201-1214.
- Carnero Diaz E, Martin F, Tagu D** (1996) Eucalypt alpha-tubulin: cDNA cloning and increased level of transcripts in ectomycorrhizal root system. *Plant Molecular Biology*, **31**: 905-910.
- Carvalho AMP** (2005) *Etnobotánica del Parque Natural de Montesinho. Plantas, tradición y saber popular en un territorio del Nordeste de Portugal*. Tese de Doutoramento. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.

- Casarin V, Plassard C, Souche G, Arvieu J-C** (2003) Quantification of oxalate ions and protons released by ectomycorrhizal fungi in rhizosphere soil. *Agronomie*, **23**: 461-469.
- Castro ML** (2002) *Micoecologia e Micosociologia: Introdução à Sistematização*. Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança.
- Chapela IH, Boddy L, Rayner ADM** (1988) Structure and development of fungal communities in beech logs four and half years after felling. *FEMS Microbiology Ecology*, **53**: 59-70.
- Chapman B, Xiao G, Myers S** (2004) Early results from field trials using *Hypholoma fasciculare* to reduce *Armillaria ostoyae* root disease. *Canadian Journal of Botany*, **82**: 962-969.
- Cheung LM, Cheung PCK** (2005) Mushroom extracts with antioxidant activity against lipid peroxidation. *Food Chemistry*, **89**: 403-409.
- Clérivet A, Déon V, Alami I, Lopez F, Geiger J-P, Nicole M** (2000) Tyloses and gels associated with cellulose accumulation in vessels are responses of plane tree seedlings (*Platanus xacarifolia*) to the vascular fungus *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. *Trees*, **15**: 25-31.
- Cordeiro MCR, de Sá MFG** (1999) Biotecnologia e resistência a patógenos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, **10**: 34-39.
- Courtecuisse R** (1999) *Mushrooms of Britain and Europe*. HarperCollins Publishers, London.
- Courtecuisse R, Duhem B** (1995) *Mushrooms and Toadstools of Britain and Europe*. HarperCollins Publishers, London.
- Courtecuisse R, Duhem B** (2005) *Guía de los hongos de la Península Ibérica, Europa y Norte de África*. Ediciones Omega, Barcelona.
- Cox KD, Scherm H** (2006) Interaction dynamics between saprobic lignicolous fungi and *Armillaria* in controlled environments: Exploring the potential for competitive exclusion of *Armillaria* on peach. *Biological Control*, **37**: 291-300.
- Crews L** (1998) *Wound-induced xylem mucilage in Zea mays L. roots traps invaders and keeps vessels functional*. Tese de Doutorado. Carleton University. Ottawa, Ontario.
- Cristóvão A, Baptista A** (2006) Os cogumelos silvestres no Douro-Duero. In *Anais da Associação Micológica "A Pantorra": Os cogumelos e a criança*. Vol. 6 Associação Micológica "A Pantorra", pp. 13-23.
- Critchley DR, Holt MR, Barry ST, Priddle H, Hemmings L, Norman J** (1999) Integrin-mediated cell adhesion: the cytoskeletal connection. *Biochemical Society Symposium*, **65**: 6579-6599.
- Dagnelis P** (1973) *Estatística, Teoria e Métodos*. Vol. 1. Publicações Europa América, Sintra.
- De Gara L, Pinto MC, Tommasi F** (2003) The antioxidant system vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiology and Biochemistry*, **41**: 863-870.
- de Vocht ML, Reviakine I, Wösten HAB, Brisson A, Wessels JGH, Robillard GT** (2000) Structural and functional role of the disulfide bridges in the hydrophobin SC3. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**: 28428-28432.
- de Vries OMH, Fekkes MP, Wösten HAB, Wessels JGH** (1993) Insoluble hydrophobin complexes in the walls of *Schizophyllum commune* and other filamentous fungi. *Archives of Microbiology*, **159**: 330-335.
- Deacon JW** (1997) *Modern Mycology*. Blackwell Science, London, England.
- Desikan R, Neill SJ, Hancock JT** (2000) Hydrogen peroxide-induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Free Radical Biology and Medicine*, **28**: 773-778.
- Dickson GC** (1997) Fungi are not plants - practical problems and conservation. *Brazilian Wildlife*, **9**: 17-21.
- Diez J, Anta B, Manjon JL, Honrubia M** (2001) Genetic variability of *Pisolithus* isolates associated with native hosts and exotic *Eucalyptus* in the western mediterranean region. *New Phytologist*, **149**: 577-587.
- Dighton J, Mason PA** (1985) Mycorrhizal dynamics during forest tree development. In *Developmental Biology of Higher Fungi*. (D. Moore, L.A. Casselton, D.A. Wood, JC Frankland, eds.) Cambridge University Press, New York, pp. 117-139.
- Ditengou F, Lapeyrie F** (2000) Hypaphorine from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* counteracts activities of indole-3-acetic acid and ethylene but not synthetic auxins in eucalypt seedlings. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **13**: 151-158.

- Ditengou F, Béguiristain T, Lapeyrie F** (2000) Root hair elongation is inhibited by hypaphorine, the indole alkaloid from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, and restored by indole-3-acetic acid. *Planta*, **211**: 722-728.
- Ditengou F, Raudaskoski M, Lapeyrie F** (2003) Hypaphorine, an indole-3-acetic acid antagonist delivered by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, induces reorganisation of actin and the microtubule cytoskeleton in *Eucalyptus globulus* ssp *bicostata* root hairs. *Planta*, **218**: 217-225.
- Dixon RA, Lamb CJ** (1990) Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **41**: 339-367.
- Doke N, Miura Y, Sanchez LM, Park H-J, Noritake T, Yoshioka H, Kawakita K** (1996) The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence - a review. *Gene*, **179**: 45-51.
- Dong Z, McCully ME, Canny MJ** (1997) Does *Acetobacter diazotrophicus* live and move in the xylem of sugarcane stems? Anatomical and physiological data. *Annals of Botany*, **80**: 147- 158.
- Donnelly DP, Boddy L** (2001) Mycelial dynamics during interactions between *Stropharia caerulea* and other cord-forming, saprotrophic basidiomycetes. *New Phytologist*, **151**: 691-704.
- Dowson CG, Rayner ADM, Boddy L** (1988a) Inoculation of mycelial cord-forming basidiomycetes into woodland soil and litter. I. Initial establishment. *New Phytologist*, **109**: 335-341.
- Dowson CG, Rayner ADM, Boddy L** (1988b) Inoculation of mycelial cord-forming basidiomycetes into woodland soil and litter. II. Resource capture and persistence. *New Phytologist*, **109**: 343-349.
- Dowson CG, Rayner ADM, Boddy L** (1988c) The form and outcome of mycelial interactions involving cord-forming decomposer basidiomycetes in homogeneous and heterogeneous environments. *New Phytologist*, **109**: 423-432.
- Dowson CG, Springham P, Rayner ADM, Boddy L** (1989) Resource relationships of foraging mycelial systems of *Phanerochaete velutina* and *Hypholoma fasciculare* in soil. *New Phytologist*, **111**: 501-509.
- Duplessis S, Courty P-E, Tagu D, Martin F** (2005) Transcript patterns associated with ectomycorrhiza development in *Eucalyptus globulus* and *Pisolithus microcarpus*. *New Phytologist*, **165**: 599-611.
- Duplessis S, Sorin C, Voiblet C, Palin B, Martin F, Tagu D** (2001) Cloning and expression analysis of a new hydrophobin cDNA from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus*. *Current Genet*, **39**: 335-339.
- Durrieu G** (1993) *Écologie des Champignons*. Masson, Paris.
- Dutton MV, Evans CS** (1996) Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Canadian Journal of Microbiology*, **42**: 881-895.
- Dutton MV, Evans CS, Atkey PT, Wood DA** (1993) Oxalate production by basidiomycetes, including the white-rot species *Coriolus versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **39**: 5-10.
- Eaton GK, Ayres MP** (2002) Plasticity and constraint in growth and protein mineralization of ectomycorrhizal fungi under simulated nitrogen deposition. *Mycologia*, **94**: 921-932.
- ECCF** (2002) *Endangered fungi of Europe, proposed to be protected*. European Council for the Conservation of Fungi, Strasbourg.
- Egger KN** (1994) Molecular analysis of ectomycorrhizal fungal communities. *Canadian Journal of Botany*: 1415-1422.
- El-Shatnawi MKJ, Makhadmeh IM** (2001) Ecophysiology of plant-rhizosphere system. *Journal of Agronomy & Crop Science*, **187**: 1-9.
- Epstein L, Nicholson RL** (1997) Adhesion of spores and hyphae to plant surfaces. In *Part A. Plant Relationships. The Mycota*. Vol. V (GC Carroll, P Tudzynski, eds.) Springer-Verlag, Berlin, pp. 11-25.
- Eveling DW, Wilson RN, Gillespie ES, Bataille A** (1990) Environmental effects on sporocarp counts over fourteen years in a forest area. *Mycological Research*, **94**: 998-1002.
- Fageria NK, Stone LF** (2006) Physical, Chemical, and Biological changes in the rhizosphere and nutrient availability. *Journal of Plant Nutrition*, **29**: 1327-1356.
- Fellner R** (1989) Mycorrhizae - forming fungi as bioindicators of air pollution. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **28**: 115-120.

- Fellner R, Soukup F** (1991) Mycological monitoring in the air-polluted regions of the Czech Republic. *Communicationes Instituti Forestalis Cechoslovaca*, **17**: 125-137.
- Ferreira ICFR, Baptista P, Vilas-Boas M, Barros L** (2007) Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: individual cap and stipe activity. *Food Chemistry*, **100**: 1511-1516.
- Ferris R, Peace AJ, Newton AC** (2000) Macrofungal communities of lowland Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karsten.) plantations in England: relationships with site factors and stand structure. *Forest Ecology and Management*, **131**: 255-267.
- Feugey L, Strullu D-G, Poupard P, Simoneau P** (1999) Induced defence responses limit Hartig net formation in ectomycorrhizal birch roots. *New Phytologist*, **144**: 541-547.
- Fitter AH, Garbaye J** (1994) Interactions between mycorrhizal fungi and other soil organisms. *Plant and Soil*, **159**: 123-132.
- Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JF** (1997) Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum*, **100**: 241-254.
- Fracchia S, García-Romera I, Godeas A, Ocampo JA** (2000) Effect of the saprophytic fungus *Fusarium osyosporum* on arbuscular mycorrhizal colonization and growth of plants in greenhouse and field trials. *Plant and Soil*, **223**: 175-184.
- Fracchia S, Sampedro I, Scervino JM, García-Romera I, Ocampo JA, Godeas A** (2004) Influence of saprobe fungi and their exudates on arbuscular mycorrhizal symbioses. *Symbiosis*, **36**: 169-182.
- Fracchia S, Mujica MT, García-Romera I, Garcia-Garrido JM, Martín J, Ocampo J, Godeas A** (1998) Interactions between *Glomus mosseae* and arbuscular mycorrhizal sporocarp-associated saprophytic fungi. *Plant and Soil*, **200**: 131-137.
- Freitag M, Morrell JJ** (1992) Changes in selected enzyme activities during growth of pure and mixed cultures of the white-rot decay fungus *Trametes versicolor* and the potential biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*, **38**: 317-323.
- Fries N, Serck-Hanssen K, Hall-Dimberg L, Theander O** (1987) Abietic acid, an activator of basidiospore germination in ectomycorrhizal species of the genus *Suillus* (Boletaceae). *Experimental Mycology*, **11**: 360-363.
- García-Garrido JM, Ocampo J** (2002) Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of Experimental Botany*, **53**: 1377-1386.
- García-Limones C, Hervás A, Navas-Cortés JÁ, Jiménez-Díaz RM, Tena R** (2002) Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **61**: 325-337.
- García-Romera I, Garcia-Garrido JM, Martin JP, Jr., Fracchia S, Mujica MT, Godeas A, Ocampo J** (1998) Interactions between saprotrophic *Fusarium* strains and arbuscular mycorrhizas of soybean plants. *Symbiosis*, **24**: 235-246.
- Garcia MM, Carvalho M, Azevedo J** (2006) Contribuição para a caracterização da recolha comercial de macrofungos comestíveis no distrito de Bragança, Portugal. In *Anais da Associação Micológica "A Pantorra": Os Cogumelos e a Criança*. Vol. 6 Associação Micológica "A Pantorra", pp. 141-153.
- Gardes M, Bruns TD** (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, **2**: 113-118.
- Gardner JH, Malajczuk N** (1988) Recolonisation of rehabilitated bauxite mine sites in Western Australia by mycorrhizal fungi. *Forest Ecology and Management*, **24**: 27-42.
- Gaspar T, Franck T, Bisbis B, Kevers C, Jouve L, Hausman JF, Dommès J** (2002) Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*, **37**: 263-285.
- Gay G, Normand L, Marmeisse R, Sotta B, Debaud JC** (1994) Auxin overproducer mutants of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnési have increased mycorrhizal activity. *New Phytologist*, **128**: 645-657.
- Gayoso C, Pomar F, Merino F, Bernal MA** (2004) Oxidative metabolism and phenolic compounds in *Capsicum annuum* L. var. *annuum* infected by *Phytophthora capsici* Leon. *Scientia Horticulturae*, **102**: 1-13.

- Giollant M, Guillot J, Damez M, Dusser M, Didier P, Didier E** (1993) Characterization of a lectin from *Lactarius deterrimus*. Research on the possible involvement of the fungal lectin in recognition between mushroom and spruce during the early stages of mycorrhizae formation. *Plant Physiology*, **101**: 513-522.
- Giovannetti M, Sbrana C** (1998) Meeting a non-host: the behaviour of AM fungi. *Mycorrhiza*, **8**: 123-130.
- Godeas A, Fracchia S, Mujica MT, Ocampo JA** (1999) Influence of soil impoverishment on the interaction between *Glomus mosseae* and saprobe fungi. *Mycorrhiza*, **9**: 185-189.
- Gomes EA, Kasuya MCM, de Barros EG, Borges AC** (2002) Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. *Genetics and Molecular Biology*, **25**: 477-483.
- Gross E, Casagrande LIT, Caetano FH** (2004) Ultrastructural study of ectomycorrhizas on *Pinus caribaea* Morelet. var. *hondurensis* Barr. & Golf. seedlings. *Acta Botanica Brasílica*, **18**: 1-7.
- Guimil S, Chang HS, Zhu T, Sesma A, Osbourn A, Roux C, Ioannidis V, Oakeley EJ, Docquier M, Descombes P, Briggs SP, Paszkowski U** (2005) Comparative transcriptomics of rice reveals an ancient pattern of response to microbial colonization. *Proceedings of Natural Academy of Sciences*, **102**: 8066-8070.
- Guinberteau J, Courtecuisse R** (1997) Diversité des champignons (surtout mycorrhiziens) dans les écosystèmes forestiers actuels. *Revue forestière française*, **XLIX**: 25-39.
- Hall I, Yun W** (2002) Truffles and other mycorrhizal mushrooms - some new crops for the southern hemisphere. In *Edible Mushrooms and their Cultivation. Second International Workshop on Edible Mycorrhizal Fungi*. (I Hall, W Yun, E Danell, A Zambonelli, eds.), New Zealand.
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG** (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell*, **8**: 1773-1791.
- Harrison MJ** (1999) Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**: 361-389.
- Hawksworth DL** (2001) The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, **105**: 1422-1432.
- Hebe G, Hager A, Salzer P** (1999) Initial signalling processes induced by elicitors of ectomycorrhiza-forming fungi in spruce cells can also be triggered by G-protein-activating mastoparan and protein phosphatase-inhibiting cantharidin. *Planta*, **207**: 418-425.
- Heilmann-Clausen J, Boddy L** (2005) Inhibition and stimulation effects in communities of wood decay fungi: exudates from colonized wood influence growth by other species. *Microbial Ecology*, **49**: 399-406.
- Henrion B, Le Tacon F, Martin F** (1992) Rapid identification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal RNA genes. *New Phytologist*, **122**: 289-298.
- Hirsch AM, Bauer WD, Bird DM, Cullimore J, Tyler B, J. Y** (2003) Molecular signals and receptors: controlling rhizosphere interacting between plants and other organisms. *Ecology*, **84**: 858-868.
- Holmer L, Stenlid J** (1997) Competitive hierarchies of wood decomposing basidiomycetes in artificial systems based on variable inoculum size. *Oikos*, **79**: 77-84.
- Horan DP, Chilvers GA** (1990) Chemotropism: the key to ectomycorrhizal formation? *New Phytologist*, **116**: 297-301.
- Inbar J, Menendez A, Chet I** (1996) Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. *Soil Biology and Biochemistry*, **28**: 757-763.
- Inglis GD, Kawchuk LM** (2002) Comparative degradation of oomycete, ascomycete, and basidiomycete cell walls by mycoparasitic and biocontrol fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, **48**: 60-70.
- Inzé D, Van Montagu M** (1995) Oxidative stress in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, **6**: 153-158.
- Isaac S** (1998) What Factors determine the Duration of the Dormancy of Fungus Spores prior to Germination? *Mycologist*, **12**: 38-39.
- Jambois A, Dauphin A, Kawano T, Ditengou FA, Bouteau F, Legue V, Lapeyrie F** (2005) Competitive antagonism between IAA and indole alkaloid hypaphorine must contribute to regulate ontogenesis. *Physiologia Plantarum*, **123**: 120-129.

- Jeffries P, Gianinazzi S, Perotto S, Turnau K, Barea JM** (2003) The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of Soils*, **37**: 1-16.
- Jennings DH, Lysek G** (1996) *Fungal Biology: Understanding the Fungal Lifestyle*. BIOS Scientific Publishers, Oxford.
- Jiménez A, Hernández JÁ, del Río A, Sevilla F** (1997) Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology*, **114**: 275-284.
- Johansson T, Le Quéré A, Ahren D, Söderström B, Erlandsson R, Lundeberg J, Uhlén M, Tunlid A** (2004) Transcriptional responses of *Paxillus involutus* and *Betula pendula* during formation of ectomycorrhizal root tissue. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **17**: 202-215.
- Jonsson L, Dahlberg A, Brandrud TE** (2000) Spatiotemporal distribution of an ectomycorrhizal community in an oligotrophic Swedish *Picea abies* forest subjected to experimental nitrogen addition: above- and below-ground views. *Forest Ecology and Management*, **132**: 143-156.
- Kampichler C, Rolschewski J, Donnelly DP, Boddy L** (2004) Collembolan grazing affects the growth strategy of the cord-forming fungus *Hypholoma fasciculare*. *Soil Biology & Biochemistry*, **36**: 591-599.
- Kapulnik Y, Volpin H, Itzhaki H, Ganon D, Galili S, David R, Shaul O, Elad Y, Chet I, Okon Y** (1996) Suppression of defence responses in mycorrhizal alfalfa tobacco roots. *New Phytologist*, **133**: 59-64.
- Karabaghli-Degron C, Sotta B, Bonnet M, Gay G, Le Tacon F** (1998) The auxin transport inhibitor 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) inhibits the stimulation of *in vitro* lateral root formation and the colonization of the tap-root cortex of Norway spruce (*Picea abies*) seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *New Phytologist*, **140**: 723-733.
- Kaska DD, Myllylä R, J.B. C** (1999) Auxin transport inhibitors act through ethylene to regulate dichotomous branching of lateral root meristems in pine. *New Phytologist*, **142**: 49-58.
- Keddy PA** (1989) *Competition*. Chapman and Hall, NY, USA.
- Keizer PJ, Arnolds E** (1994) Succession of ectomycorrhizal fungi in roadside verges planted with common oak (*Quercus robur* L.) in Drenthe, The Netherlands. *Mycorrhiza*, **4**: 147-159.
- Kennedy AC** (1998) The rhizosphere and spermosphere. In *Principles and Applications of Soil Microbiology*. (DM Sylvia, JJ Fuhrmann, PG Hartel, DA Zuberer, eds.) Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, pp. 389-407.
- Kershaw MJ, Talbot NJ** (1998) Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. *Fungal Genetics and Biology*, **23**: 18-33.
- Kim S-J, Hiremath ST, Podila GK** (1999) Cloning and identification of symbiosis-regulated genes from the ectomycorrhizal *Laccaria bicolor*. *Mycological Research*, **103**: 168-172.
- Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA** (2001) *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. CABI Bioscience, UK.
- Klein DA, Paschke MW** (2004) Filamentous Fungi: the indeterminate lifestyle and microbial ecology. *Microbial Ecology*, **47**: 224-235.
- Kleinwächter P, Luhmann U, Schlegel B, Heinze S, Härtl A, Kiet TT, Gräfe U** (1999) New fasciculol-type triterpene compounds from *Hypholoma fasciculare*. *Journal of Basic Microbiology*, **39**: 345-349.
- Koide RT, Kabir Z** (2001) Nutrient economy of red pine is affected by interactions between *Pisolithus tinctorius* and other forest-floor microbes. *New Phytologist*, **150**: 179-188.
- Kolo K, Claeys Ph** (2005) *In vitro* formation of Ca-oxalates and the mineral glushinskite by fungal interaction with carbonate substrates and seawater. *Biogeosciences*, **2**: 277-293.
- Kpémoua K, Boher B, Nicole M, Calatayud P, Geiger JP** (1996) Cytochemistry of defense responses in cassava infected by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *Canadian Journal of Microbiology*, **42**: 1131-1143.
- Krüger A, Peskan-Berghöfer T, Frettinger P, Herrmann S, Buscot F, Oelmüller R** (2004) Identification of premycorrhiza-related plant genes in the association between *Quercus robur* and *Piloderma croceum*, **163**: 149-157.
- Kuster H, Hohnjec N, Krajinski F, El Yahyaoui F, Manthey K, Gouzy J, Dondrup M, Meyer F, Kalinowski J, Brechenmacher L, van Tuinen D, Gianinazzi-Pearson V, Puhler A, Gamas**

- P, Becker A** (2004) Construction and validation of cDNA-based Mt6k-RIT macro- and microarrays to explore root endosymbioses in the model legume *Medicago truncatula*. *Journal of Biotechnology*, **108**: 95-113.
- Kwan AHY, Winefield RD, Sunde M, Matthews JM, Haverkamp RG, Templeton MD, Mackay JP** (2006) Structural basis for rodlet assembly in fungal hydrophobins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**: 3621-3626.
- Laganà A, Angiolini C, Loppi S, Salerni E, Perini C, Barluzzi C, De Dominicis V** (2002) Periodicity, fluctuations and successions of macrofungi in fir forest (*Abies alba* Miller) in Tuscany, Italy. *Forest Ecology and Management*, **169**: 187-202.
- Lagrange H, Jay-Allgmand C, Lapeyrie F** (2001a) Rutin, the phenolglycoside from *Eucalyptus* root exudates, stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentrations. *New Phytologist*, **150**: 349-355.
- Lagrange H, Jay-Allgmand C, Lapeyrie F** (2001b) Rutin, the phenolglycoside from eucalyptus root exudates, stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentrations. *New Phytologist*, **149**: 349-355.
- Laloi C, Apel K, Danon A** (2004) Reactive oxygen signalling: the latest news. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**: 323-328.
- Lamb C, Dixon RA** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **48**: 251-275.
- Lange M** (1978) Fungus flora in August. Ten years observations in a Danish beech wood district. *Botanisk tidsskrift*, **73**: 21-54.
- Lapeyrie F, Chilvers GA, Bhem CA** (1987) Oxalic acid synthesis by the mycorrhizal fungus *Paxillus involutus* (Batsch. Ex Fr.) Fr. *New Phytologist*, **106**: 139-146.
- Laurent P, Voiblet C, Tagu D, Carvalho D, Nehls U, De Bellis R, Balestrini R, Bauw G, Bonfante P, Martin F** (1999) A novel class of ectomycorrhiza-regulated cell wall polypeptides in *Pisolithus tinctorius*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **12**: 862-871.
- Le Quéré A, Wright DP, Söderström B, Tunlid A, Johansson T** (2005) Global patterns of gene regulation associated with the development of ectomycorrhiza between birch (*Betula pendula* Roth.) and *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **18**: 659-673.
- Leake JR, Donnelly DP, Saunders EM, Boddy L, Read DJ** (2001) Rates and quantities of carbon flux to ectomycorrhizal mycelium following <sup>14</sup>C pulse labeling of *Pinus sylvestris* seedlings: effects of litter patches and interaction with a wood-decomposer fungus. *Tree Physiology*, **21**: 71-82.
- Lei J, Lapeyrie F, Malajczuk N, Dexheimer J** (1990b) Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch on roots of *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake *in vitro*. II. Ultrastructural and biochemical changes at the early stage of mycorrhiza formation. *New Phytologist*, **116**: 115-122.
- Lei J, Ding H, Lapeyrie F, Piché Y, Malajczuk N, Dexheimer J** (1990a) Ectomycorrhizal formation on the roots of *Eucalyptus globulus* and *Pinus caribaea* with two isolates of *Pisolithus tinctorius*: structural and cytochemical observations. In *Endocytobiology*. Vol. IV (P Nardon, V Gianinazzi-Pearson, AM Greiner, L Margulis, DC Smith, eds.) INRA, Paris, France, pp. 123-126.
- Lindahl B, Stenlid J, Finlay R** (2001) Effects of resource availability on mycelial interactions and <sup>32</sup>P transfer between a saprotrophic and an ectomycorrhizal fungus in soil microcosms. *FEMS Microbiology Ecology*, **38**: 43-52.
- Lindahl B, Stenlid J, Olsson S, Finlay R** (1999) Translocation of <sup>32</sup>P between interacting mycelia of a wood-decomposing fungus and ectomycorrhizal fungi in microcosm systems. *New Phytologist*, **144**: 183-193.
- Linder MB, Szilvay GR, Nakari-Setälä TN, Penttilä ME** (2005) Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, **29**: 877-896.
- Lo KM, Cheung PCK** (2005) Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. *alba*. *Food Chemistry*, **89**: 533-539.
- Loguercio-Leite C, Groposo C, Dreschler-Santos ER, Figueiredo NF, Godinho PS, Abrão RL** (2006) A particularidade de ser um fungo –I. Constituintes celulares. *Biotemas*, **19**: 17-27.

- Lu Z, Tombolini R, Woo S, Zeilinger S, Lorito M, Jansson JK** (2004) *In vivo* study of *Trichoderma*-pathogen interactions using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 3073-3081.
- Lum MR, Hirsch AM** (2003) Roots and their symbiotic microbes: strategies to obtain nitrogen and phosphorus in a nutrient-limiting environment. *Journal of Plant Growth Regulation*, **21**: 368-382.
- Luoma DL, Frenkel RE, Trappe JM** (1991) Fruiting of hypogeous sporocarps in Oregon Douglas-fir forests: seasonal and habitat variation. *Mycologia*, **83**: 335-353.
- Madsen EB, Madsen LH, Radutoiu S, Olbryt M, Rakwalska M, Szczyglowski K, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, Stougaard J** (2003) A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature*, **425**: 637-640.
- Mahalingam R, Fedoroff N** (2003) Stress response, cell death and signalling: the many faces of reactive oxygen species. *Physiologia Plantarum*, **119**: 56-68.
- Mankel A, Krause K, Kothe E** (2002) Identification of a hydrophobin gene that is developmentally regulated in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma terreum*. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 1408-1413.
- Manzi P, Aguzzi A, Pizzoferrato L** (2001) Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chemistry*, **73**: 321-325.
- Manzi P, Marconi S, Aguzzi A, Pizzoferrato L** (2004) Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking. *Food Chemistry*, **84**: 201-206.
- MAP** (1977) *Sector Fertilidade do Solo. Documentação 2*. Ministério da Agricultura e Pesca.
- Marchand A** (1971-1986) *Champignons du Nord et du Midi*. Vols.1-9. Société Mycologique des Pyrénées Méditerranéennes, Perpignan.
- Marschner H** (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press, San Diego.
- Martin F, Tagu D** (1995) Ectomycorrhiza development: a molecular perspective. In *Mycorrhiza. Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*. (A Varma, B Hock, eds.) Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, pp. 30-58.
- Martin F, Duplessis S, Ditengou F, Lagrange H, Voiblet C, Lapeyrie F** (2001a) Development cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signals and communication genes. *New Phytologist*, **151**: 145-154.
- Martin F, Duplessis S, Ditengou F, Lagrange H, Voiblet C, Lapeyrie F** (2001b) Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signals and communication genes. *New Phytologist*, **151**: 145-154.
- Martin F, Laurent P, de Carvalho D, Voiblet C, Balestrini R, Bonfante P, Tagu D** (1999) Cell wall proteins of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*: identification, function, and expression in symbiosis. *Fungal Genetics and Biology*, **27**: 161-174.
- Martin KJ, Rygielwicz PT** (2005) Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology*, **5**: 28.
- Martinez A, Obertello M, Pardo A, Ocampo JA, Godeas A** (2004) Interactions between *Trichoderma pseudokoningii* strains and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Gigaspora rosea*. *Mycorrhiza*, **14**: 79-84.
- Martins A** (1997) *Micorrização in vitro de plantas micropropagadas de castanheiro (Castanea sativa Mill)*. Série de Estudos Escola Superior Agrária. Instituto Politécnico de Bragança, Bragança.
- Martins A** (2004) *Micorrização controlada de Castanea sativa Mill.: aspectos fisiológicos da micorrização in vitro e ex vitro*. Tese de Doutoramento. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. 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.
- Martins A, Casimiro A, Pais MMS** (1997) Influence of mycorrhization on physiological parameters of micropropagated *Castanea sativa* Mill. plants. *Mycorrhiza*, **7**: 161-165.
- Marx DH** (1969) The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*, **59**: 153-163.
- Marx DH** (1977) Tree host range and world distribution of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Canadian Journal of Microbiology*, **23**: 217-223.

- Marx DH, Cordell CE** (1989) The use of specific ectomycorrhizas to improve artificial forestation practices. In *Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1-21.
- Marx DH, Cordell CE, Kenney DS, Mexal JG, Artman JD, Riffle JW, Molina RJ** (1984) *Commercial Vegetative Inoculum of Pisolithus tinctorius and Inoculation Techniques for Development of Ectomycorrhizae on Bare-rooted Tree Seedlings*. Vol. 25. Forest Science Monographie.
- Mason PA, Last FT, Pelham J, Ingleby K** (1982) Ecology of some fungi associated with an ageing stand of birches (*Betula pendula* and *B. pubescens*). *Forest Ecology and Management*, **4**: 19-39.
- Mason PA, Last FT, Wilson J, Deacon JW, Fleming LV, Fox FM** (1987) Fruiting and succession of ectomycorrhizal fungi. In *Fungal Infection of Plant*. (GF Pegg, PG Ayres, eds.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 253-268.
- Massicotte HB, Melville LH, Peterson RL** (2005) Structural features of mycorrhizal associations in two members of the Monotropeae, *Monotropa uniflora* and *Pterospora andromedea*. *Mycorrhiza*, **15**: 101-110.
- Matsuda Y, Hijii N** (1998) Spatiotemporal distribution of fruitbodies of ectomycorrhizal fungi in an *Abies firma* forest. *Mycorrhiza*, **8**: 131-138.
- Mattila P, Könkö K, Eurola M, Pihlava J-M, Astola J, Vahteristo L, Hietaniemi V, Kumpulainen J, Valtonen M, Piironen V** (2001) Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**: 2343-2348.
- Mau J-L, Chang C-N, Huang S-J, Chen C-C** (2004) Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia. *Food Chemistry*, **87**: 111-118.
- McAfee BJ, Fortin JA** (1986) Competitive interactions of ectomycorrhizal mycobionts under field conditions. *Canadian Journal of Botany*, **64**: 848-852.
- McAllister CB, Garcia-Romera I, Godeas A, Ocampo JA** (1994) Interaction between *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani* and *Glomus mosseae*: effect on plant growth, arbuscular mycorrhizas and saprophytic population. *Soil Biology and Biochemistry* **26**: 1363-1367.
- Mehdy M, Sharma YK, Sathasivan K, Bays NW** (1996) The role of activated oxygen species in plant disease resistance. *Physiologia Plantarum*, **98**: 365-374.
- Meinhardt SW, Cheng W, Kwon SY, Donohue CM, Rasmussen JB** (2002) Role of the Arginyl-Glycyl-Aspartic motif in the action of Ptr ToxA produced by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Plant Physiology*, **130**: 1545-1551.
- Meireles MTG** (1997) *Identificação e isolamento in vitro dos macromicetas num castiçal de Bragança*. Relatório Final de Licenciatura em Gestão de Recursos Florestais. Escola Superior Agrária de Bragança
- Mellersh DG, Heath MC** (2001) Plasma membrane-cell wall adhesion is required for expression of plant defense responses during fungal penetration *Plant Cell*, **13**: 413-424.
- Mendgen K, Hahn M, Deising H** (1996) Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, **34**: 367-386.
- Menezes A** (1990) *Inventário de cogumelos em soutos e castiçais de Trás-os-Montes*. Relatório Final de Licenciatura em Engenharia Florestal. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real.
- Menotta M, Amicucci A, Sisti D, Gioacchini AM, Stocchi V** (2004) Differential gene expression during pre-symbiotic interaction between *Tuber borchii* Vittad. and *Tilia americana* L. *Current Genetics*, **46**: 158-165.
- Mensen R, Hager A, Salzer P** (1998) Elicitor-induced changes of wall-bound and secreted peroxidase activities in suspension-cultured spruce (*Picea abies*) cells are attenuated by auxins. *Physiologia Plantarum*, **102**: 539-546.
- Mithöfer A** (2002) Suppression of plant defence in rhizobia-legume symbiosis. *Trends in Plant Science*, **7**: 440-444.
- Mittler R** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, **7**: 405-410.
- Mittova V, Volokita M, Guy M, Tal M** (2000) Activities of SOD and the ascorbate-glutathione cycle enzymes in subcellular compartments in leaves and roots of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennelli*. *Physiologia Plantarum*, **110**: 42-51.

- Moerschbacher B, Mendgen K** (2001) Structural aspects of defense. In *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*. (AJ Slusarenko, RSS Fraser, LC Loon, eds.) Kluwer Academic Publishers, London, pp. 231-277.
- Moldes J** (1996) Macromicetos de las zonas de Barra y Area de Meán (Cangas do Morrazo). In *Premio Galicia de Micología (1983-1991)*. Xunta de Galicia, Santiago de Compostela, pp. 79-97.
- Moore D** (1998) Fungal Morphogenesis. In *Developmental and Cell Biology Series*. (B J.B.L., B P.W., G P.B., K D.L., eds.) Cambridge University Press, Cambridge.
- Morel M, Jacob C, Kohler A, Johansson T, Martin F, Chalot M, Brun A** (2005) Identification of genes differentially expressed in extraradical mycelium and ectomycorrhizal roots during *Paxillus involutus-Betula pendula* ectomycorrhizal symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**: 382-391.
- Moreno AC** (2005) *Setas y Hongos de la Rioja*. Fundación Caja Rioja, Barcelona.
- Moser M** (1983) *Keys to Agarics and Boleti (Polyporales, Boletales, Agaricales, Russulales)*. Mad River Pr Inc, London.
- Moyerson B, Beever RE, Martin F** (2003) Genetic diversity of *Pisolithus* in New Zealand indicates multiple long-distance dispersal from Australia. *New Phytologist*, **160**: 569-579.
- Murphy EA, Mitchell DT** (2001) Interactions between *Tricholomopsis rutilans* and ectomycorrhizal fungi in paired culture and in association with seedlings of lodgepole pine and Sitkaspruce. *Forest Pathology*, **31**: 331-344.
- Mysore KS, Ryu C-M** (2004) Nonhost resistance: how much do we know? *Trends in Plant Science*, **9**: 97-104.
- Nara K, Nakaya H, Hogetsu T** (2003) Ectomycorrhizal sporocarp succession and production during early primary succession on Mount Fuji. *New Phytologist*, **158**: 193-206.
- Nehls U, Béguiristain T, Ditengou F, Lapeyrie F, Martin F** (1998) The expression of a symbiosis-regulated gene in eucalypt roots is regulated by auxins and hypaphorine, the tryptophan betaine of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. *Planta*, **207**: 296-302.
- Neill SJ, Desikan R, Clarke AK, Hurst RD, Hancock J** (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Biology*, **53**: 1237-1247.
- Nelson DW, Sommers LE** (1996) Total carbon, organic carbon and organica matter. In *Methods of Soil Analysis. Part 3 - Chemical Methods*. Vol 5 (DL Sparks, ed) Soil Science Society of America Book, Madison, WI.
- Nicolotti G, Varese GC** (1996) Screening of antagonistic fungi against air-borne infection by *Heterobasidion annosum* on Norway spruce. *Forest Ecology and Management*, **88**: 249-257.
- Noordeloos ME** (1988-2001) *Flora Agaricina Neerlandica: Critical Monographs on Families of Agarics and Boleti occurring in the Netherlands*. Vols.1-5. A.A. Balkema Publishers.
- O'Dell TE, Ammirati JF, Schreiner EG** (1999) Species richness and abundance of ectomycorrhizal basidiomycetes sporocarps on a moisture gradient in the *Tsuga heterophylla* zone. *Canadian Journal of Botany*, **77**: 1699-1711.
- Oda T, Tanaka C, Tsuda M** (2004) Molecular phylogeny and biogeography of the widely distributed *Amanita* species, *A. muscaria* and *A. pantherina*. *Mycological Research*, **108**: 885-896.
- Orton PD** (1986) Fungi of northern pine and birch woods. *Bulletin of the British Mycological Society*, **20**: 130-145.
- Pearce ME, Nelson EE, Malajczuk N** (1995) Effects of the cordforming saprotrophs *Hypholoma australe* and *Phanerochaete filamentosa* and of ammonium sulphamate on establishment of *Armillaria luteobubalina* on stumps of *Eucalyptus diversicolor*. *Mycological Research*, **99**: 951-956.
- Pearce MH, Malajczuk N** (1990) Inoculation of *Eucalyptus diversicolor* thinning stumps with wood decay fungi for control of *Armillaria luteobubalina*. *Mycological Research*, **94**: 32-37.
- Pegler DN, Laessoe T, Sponner BM** (1995) *British Puffballs Earthstars and Stinkhorns*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Pegler DN, Roberts PJ, Sponner BM** (1997) *Chanterelles and Tooth Fungi : An Account of the British Cantharelloid and Stipitate Hydroid Fungi*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Penas MM, Ásgeirsdóttir SA, Lasa I, Culiánez-Macia FA, Pisabarro AG, Wessels JGH, Ramirez L** (1998) Identification, characterization, and in situ detection of a fruit-body-specific hydrophobin of *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 4028-4034.

- Perelló A, Mónaco C, Simón MR, Sisterna M, Dal Bello G** (2003) Biocontrol efficacy of *Trichoderma* isolates for tan spot of wheat in Argentina. *Crop Protection*, **22**: 1099-1106.
- Peter M, Courty P-E, Kohler A, Delaruelle C, Martin D, Tagu D, Frey-Klett P, Duplessis S, Chalot M, Podila G, Martin F** (2003) Analysis of expressed sequence tags from the ectomycorrhizal basidiomycetes *Laccaria bicolor* and *Pisolithus microcarpus*. *New Phytologist*, **159**: 117-129.
- Peterson RL, Bonfante P** (1994) Comparative structure of vesicular-arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas. *Plant and Soil*, **159**: 79-88.
- Pinho-Almeida F** (1991) Listagem de fungos colectados no concelho de caldas da Rainha. *Boletim da Sociedade Broteriana*, **64**: 187-212.
- Pinho-Almeida F** (1992) Estudos taxonómicos no género *Laccaria*. *Portugalia Acta Biológica*, **16**.
- Pinho-Almeida F, Baptista Ferreira JL** (1992) Fungos de dunas do litoral sul e oeste de Portugal. *Portugalia Acta Biológica*, **16**: 61-80.
- Pinho-Almeida F, Baptista Ferreira JL** (1994) Macromicetos do parque Nacional da Peneda-Gerês. *Revista de Biologia*, **15**: 153-160.
- Pinho-Almeida F, Baptista Ferreira JL** (1997) Macromicetos da Herdade da Ribeira Abaixo (Grândola). *Portugalia Acta Biológica*, **17**: 155-183.
- Podila GK** (2002) Signalling in mycorrhizal symbioses - elegant mutants lead the way. *New Phytologist*, **154**: 541-545.
- Pratt JE, Gibbs JN, Webber JF** (1999) Registration of *Phlebiopsis gigantea* as a forest biocontrol agent in the UK: recent experience. *Biocontrol Science and Technology*, **9**: 113-118.
- Rayner ADM, Boddy L, Dowson CG** (1987) Temporary parasitism of *Coriolus* spp. by *Lenzites betulina* a strategy for domain capture in wood decay fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, **45**: 53-58.
- Redecker D, Hijri M, Dulieu H, Sanders IR** (1999) Phylogenetic analysis of a dataset of fungal 5.8S rDNA sequences shows that highly divergent copies of internal transcribed spacers reported from *Scutellospora castanea* are of ascomycete origin. *Fungal Genetics and Biology*, **28**: 238-244.
- Reignault P, Sancholle M** (2005) Plant-pathogen interactions: will the understanding of common mechanisms lead to the unification of concepts? *Comptes Rendus Biologies*, **328**: 821-833.
- Reithner B, Brunner K, Schuhmacher R, Peissl I, Seidl V, Krska R, Zeilinger S** (2005) The G protein alpha subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites. *Fungal Genetics and Biology*, **42**: 749-760.
- Resende MLV, Flood J, Ramsden JD, Rowan MG, Beale MH, Cooper RM** (1996) Novel phytoalexins including elemental sulphur in the resistance of cocoa (*Theobroma cacao* L.) to Verticillium wilt (*Verticillium dahliae* Kleb.). *Physiology Molecular Plant Pathology*, **48**: 347-359.
- Ribeiro B, Rangel J, Valentão P, Baptista P, Seabra RM, Andrade PB** (2006) Contents of carboxylic acids and two phenolics and antioxidant activity of dried portuguese wild edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**: 8530-8537.
- Richardson MJ** (1970) Studies on *Russula emetica* and other agarics in a scots pine plantation. *Transactions of the British Mycological Society*, **55**: 217-229.
- Rillig MC, Mummey DL** (2006) Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist*, **171**: 41-53.
- Rincón A, Gérard J, Dexheimer J, Le Tacon F** (2001) Effect of an auxin transport inhibitor on aggregation and attachment process during ectomycorrhiza formation between *Laccaria bicolor* S238N and *Picea abies*. *Canadian Journal of Botany*, **79**: 1152-1160.
- Rioux D, Nicole M, Simard M, Ouellette GB** (1998) Immunocytochemical evidence that secretion of pectin occurs during gel (gum) and tylosis formation in trees. *Phytopathology*, **88**: 494-505.
- Rodrigues APP** (2005) Conservação e gestão sustentável dos macrofungos. In *Anais da Associação Micológica "A Pantorra": A Floresta e os Cogumelos*. Vol. 5 Associação Micológica "A Pantorra", pp. 5-32.
- Romero-Puertas MC, Rodríguez-Serrano M, Corpas FJ, Gómez M, Del Río LA, Sandalio LM** (2004) Cadmium-induced subcellular accumulation of O<sup>2-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in pea leaves. *Plant, Cell and Environment*, **27**: 1122-1134.

- Roussel S, Nicole M, Lopez F, Ricci P, Geiger J-P, Renard M, Brun H** (1999) *Leptosphaeria maculans* and cryptogein induce similar vascular responses in tissues undergoing the hypersensitive reaction in *Brassica napus*. *Plant Science*, **144**: 17–28.
- Sadler M** (2003) Nutritional properties of edible fungi. *Nutrition Bulletin*, **28**: 305–308.
- Salerni E, Laganà A, Perini C, Loppi S, De Dominicis V** (2002) Effects of temperature and rainfall on fruiting of macrofungi in oak forest of the Mediterranean area. *Israel Journal of Plant Sciences*, **50**: 189–198.
- Salzer P, Hebe G, Hager A** (1997a) Cleavage of chitinous elicitors from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme* by host chitinases prevents induction of K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> release, extracellular alkalization and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis of *Picea abies* cells. *Planta*, **203**: 470–479.
- Salzer P, Corbière H, Boller T** (1999) Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago trunculata* roots colonized by the arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus intraradices*. *Planta*, **208**: 319–325.
- Salzer P, Hübner B, Sirrenberg A, Hager A** (1997b) Differential effect of purified spruce chitinases and beta-1,3-glucanases on the activity of elicitors from ectomycorrhizal fungi. *Plant Physiology*, **114**: 957–968.
- Salzer P, Hebe G, Reith A, Zitterell-Haid B, Stransky H, Gaschler K, Hager A** (1996) Rapid reactions of spruce cells to elicitors released from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme*, and inactivation of these elicitors by extracellular spruce cell enzymes. *Planta*, **198**: 118–126.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Santos BA** (2006) *Expressão génica do fungo Pisolithus tinctorius em etapas iniciais da interação ectomicorrízica com Castanea sativa: estudo do padrão de transcrição e de possíveis factores de regulação da simbiose*. Tese de Doutoramento. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Lisboa.
- Sauter M, Hager A** (1989) The mycorrhizal fungus *Amanita muscaria* induces chitinase activity in roots and in suspension-cultured cells of its host *Picea abies*. *Planta*, **179**: 61–66.
- Scandalios JG** (1993) Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiology*, **101**: 7–12.
- Schlechte G** (1987) Ecological studies on mycorrhizae-forming fungi in forest stands exposed to different levels of air pollution. In *Ekologie mykorrhiz a mykorrhiznich hub*. (R Fellner, ed) DT CSWTS, Pardubice, pp. 82–92.
- Schoeman MW, Webber JF, Dickinson DJ** (1996) The effect of diffusible metabolites of *Trichoderma harzianum* on *in vitro* interactions between basidiomycete isolates at two different temperature regimes. *Mycological Research*, **100**: 1454–1458.
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C** (2001) A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, **105**: 1413–1421.
- Schwacke R, Hager A** (1992) Fungal elicitors induce a transient release of active oxygen species from cultured spruce cells that is dependent on Ca<sup>2+</sup> and protein-kinase activity. *Planta*, **187**: 136–141.
- Sebastiana MG** (2006) *Identificação de genes envolvidos no reconhecimento hóspede/hospedeiro em ectomicorrizas*. Tese de Doutoramento. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Lisboa.
- Segers GC, Hamada W, Oliver RP, Spanu PD** (1999) Isolation and characterization of five different hydrophobin-encoding cDNAs from the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Molecular General Genetics*, **261**: 644–652.
- Selosse M-A, Le Tacon F** (1998) The land flora: a phototroph-fungus partnership? *Trends in Ecology and Evolution*, **13**: 15–20.
- Senn-Irlet B, Bieri G** (1999) Sporocarp succession of soil-inhabiting macrofungi in an autochthonous subalpine Norway spruce forest of Switzerland. *Forest Ecology and Management*, **124**: 169–175.
- Shaw TM, Dighton J, Sanders FET** (1995) Interactions between ectomycorrhizal and saprotrophic fungi on agar and in association with seedlings of lodgepole pine (*Pinus contorta*). *Mycological Research*, **99**: 159–165.

- Shimada M, Akamatsu Y, Tokimatsu T, Mii K, Hattori T** (1997) Possible biochemical roles of oxalic acid as a low molecular weight compound involved in brown-rot and white-rot wood decays. *Journal of Biotechnology*, **53**: 103-113.
- Shiu SH, Karlowski WM, pan R, Tzeng YH, Mayer KF, Li WH** (2004) Comparative analysis of the receptor-like kinase family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Cell*, **16**: 1220-1234.
- Sirrenberg A, Salzer P, Hager A** (1995) Induction of mycorrhiza-like structures and defence reactions in dual cultures of spruce callus and ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist*, **130**: 149-156.
- Smith JE, Molina RJ, Huso MMP, Luoma DL, McKay D, Castellano MA, Lebel T, Valachovic Y** (2002) Species richness, abundance, and composition of hypogeous and epigeous ectomycorrhizal fungal sporocarps in young, rotation-age, and old-growth stands of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) in the Cascade Range of Oregon, U.S.A. *Canadian Journal of Botany*, **80**: 186-204.
- Smith SE, Read DJ** (1997) *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London.
- Soberón J, Llorente J** (1993) The use of species accumulation functions for the prediction of species richness. *Conservation Biology*, **7**: 480-488.
- Soll DR** (2000) The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clinical Microbiology Reviews*, **13**: 332-370.
- Southwood TRE, Henderson PA** (2000) *Ecological Methods*. Blackwell Science, London.
- Stracke S, Kistner C, Yoshida S, Mulder L, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, Stougaard J, Szczygłowski K, Parniske M** (2002) A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature*, **417**: 959-962.
- Sun Y-P, Unestam T, Lucas SD, Johanson KJ, Kenne L, Finlay R** (1999) Exudation-reabsorption in mycorrhizal fungus, the dynamic interface for interaction with soil and soil microorganisms. *Mycorrhiza*, **9**: 137-144.
- Sundaram S, Kim SJ, Suzuki H, Mcquattie CJ, Hiremath ST, Podila GK** (2001) Isolation and characterization of a symbiosis-regulated *ras* from the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **14**: 618-628.
- Tagu D, Nasse B, Martin F** (1996) Cloning and characterization of hydrophobins-encoding cDNAs from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. *Gene*, **168**: 93-97.
- Tagu D, Lapeyrie F, Martin F** (2002) The ectomycorrhizal symbiosis: genetics and development. *Plant and Soil*, **244**: 97-105.
- Tagu D, De Bellis R, Balestrini R, De Vries OMH, Piccoli G, Stocchi V, Bonfante P, Martin F** (2001) Immunolocalization of hydrophobin HydPt-1 from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius* during colonization of *Eucalyptus globulus* roots. *New Phytologist*, **149**: 127-135.
- Tait K, Sayer JA, Gharieb MM, Gadd GM** (1999) Fungal production of calcium oxalate in leaf litter microcosms. *Soil Biology and Biochemistry*, **31**: 1189-1192.
- Talbot NJ, Kershaw MJ, Wakley GE, De Vries OMH, Wessels JGH, Hamer JE** (1996) MPG1 encodes a fungal hydrophobin involved in surface interactions during infection-related development of *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell*, **8**: 985-999.
- Thomas GW** (1996) Soil pH and soil acidity In *Methods of Soil Analysis. Part 3 - Chemical Methods*. Vol 5 (DL Sparks, ed) Soil Science Society of America Book, Madison, WI.
- Timonen S, Peterson RL** (2002) Cytoskeleton in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil*, **244**: 199-210.
- Timonen S, Söderström B, Raudaskoski M** (1996) Dynamics of cytoskeletal proteins in developing pine ectomycorrhiza. *Mycorrhiza*, **5**: 423-429.
- Timonen S, Finlay RD, Söderström B, Raudaskoski M** (1993) Identification of cytoskeletal components in pine ectomycorrhizas. *New Phytologist*, **124**: 83-92.
- Tofts RJ, Orton PD** (1998) The species accumulation curve for Agarics and Boleti from a Caledonian Pinewood. *Mycologist*, **12**: 98-102.
- Torres MA, Jones JDG, Dangel JL** (2006) Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology*, **141**: 373-378.
- Trillas MI, Cotxarrera L, Casanova E, Cortadellas N** (2000) Ultrastructural changes and localization of chitin and callose in compatible and incompatible interactions between carnation callus and *Fusarium oxysporum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **56**: 107-116.

- Vainio EJ, Lipponen K, Hantula J** (2001) Persistence of a biocontrol strain of *Phlebiopsis gigantea* in conifer stumps and its effects on within-species genetic diversity. *Forest Pathology*, **31**: 285-295.
- Valdez M** (1986) Survival and growth of pine with specific ectomycorrhizae after 3 years on a high eroded site. *Canadian Journal of Botany*, **64**: 885-888.
- van der Heijden MGA** (2004) Arbuscular mycorrhizal fungi as support systems for seedling establishment in grassland. *Ecology Letters*, **7**: 293-303.
- Vetter J** (2003) Data on sodium content of common edible mushrooms. *Food Chemistry*, **81**: 589-593.
- Voiblet C, Duplessis S, Encelot N, Martin F** (2001) Identification of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. *The Plant Journal*, **25**: 181-191.
- Wald P, Crockatt M, Gray V, Boddy L** (2004) Growth and interspecific interactions of the rare oak polypore *Piptoporus quercinus*. *Mycological Research*, **108**: 189-197.
- Walker C, Schüßler A** (2004) Nomenclatural clarifications and new taxa in the Glomeromycota. *Mycological Research*, **108**: 981-982.
- Watling R** (1995) Assessment of fungal diversity: macromycetes, the problems. *Canadian Journal of Botany*, **73**: S15-S24.
- Webster J** (1980) *Introduction to Fungi*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Weiss M, Schmidt J, Neumann D, Wray V, Christ R, Strack D** (1999) Phenylpropanoids in mycorrhizas of the Pinaceae. *Planta*, **208**: 491-502.
- Weiss M, Mikolajewski S, Peipp H, Schmitt U, Schmidt J, Wray V, Strack D** (1997) Tissue-specific and development-dependent accumulation of phenylpropanoids in Larch Mycorrhizas. *Plant Physiology*, **114**: 15-27.
- Wells JM, Boddy L** (2002) Interspecific carbon exchange and cost of interactions between basidiomycete mycelia in soil and wood. *Functional Ecology*, **16**: 153-161.
- Werner A, Zadworny M** (2003) *In vitro* evidence of mycoparasitism of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* against *Mucor hiemalis* in the rhizosphere of *Pinus sylvestris*. *Mycorrhiza*, **13**: 41-47.
- Werner A, Zadworny M, Idzikowska K** (2002) Interaction between *Laccaria laccata* and *Trichoderma virens* in co-culture and in the rhizosphere of *Pinus sylvestris* grown *in vitro*. *Mycorrhiza*, **12**: 139-145.
- Wessels JGH** (1994) Developmental regulation of fungal cell wall formation. *Annual Review of Phytopathology*, **32**: 413-437.
- Wessels JGH** (1996) Fungal hydrophobins: proteins that function at an interface. *Trends in Plant Science*, **1**: 9-15.
- Wessels JGH** (1997) Hydrophobins: proteins that change the nature of the fungal surface. *Advances in Microbial Physiology*, **38**: 1-45.
- Whipps JM** (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, **52**: 487-511.
- White NA, Sturrock C, Ritz K, Samson WB, Bown J, Staines HJ, Palfreyman JW, Crawford J** (1998) Interspecific fungal interactions in spatially heterogeneous systems. *FEMS Microbiology Ecology*, **27**: 21-32.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J** (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. (MA Innis, DH Gelfand, JJ Sninsky, e T. J. White, eds.) Academic Press, San Diego, pp. 315-322.
- Whiteford JR, Spanu PD** (2002) Hydrophobins and the interactions between fungi and plants. *Molecular Plant Pathology*, **3**: 391-400.
- Wiest A, Grzegorski D, Xu BW, Goulard C, Rebuffat S, Ebbolle DJ, Bodo B, Kenerley C** (2002) Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, **277**: 20862-20868.
- Wilcox HE** (1990) Mycorrhizal associations. In *Biotechnology of Plant-Microbe Interactions*. (JP Nakas, C Hagedorn, eds.) McGraw-Hill, New York, pp. 227-255.

- Williams JS, Hall SA, Hawkesford MJ, Beale MH, Cooper RM** (2002) Elemental sulfur and thiol accumulation in tomato and defense against a fungal vascular pathogen. *Plant Physiology*, **128**: 150–159.
- Winter G** (1884) Contributiones ad floram mycologicam lusitanicam. *Boletim da Sociedade Broteriana*, **1<sup>a</sup> série II**: 32-57.
- Wojtaszek P** (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal*, **322**: 681-692.
- Woods CM, Woodward S, Redfern DB** (2005) *In vitro* interactions in artificial and wood-based media between fungi colonizing stumps of Sitka spruce. *Forest Pathology*, **35**: 213-229.
- Woods CM, Woodward S, Pinard MA, Redfern DB** (2006) Colonization of sitka spruce stumps by decay-causing hymenomycetes in paired inoculations. *Mycological Research*, **110**: 854-868.
- Wösten HAB** (2001) Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annual Review of Microbiology*, **55**: 625-646.
- Wösten HAB, de Vries OMH, Wessels JGH** (1993) Interfacial selfassembly of a fungal hydrophobin into a hydrophobic rodlet layer. *Plant Cell*, **5**: 1567–1574.
- Wösten HAB, Schuren FHJ, Wessels JGH** (1994) Interfacial selfassembly of a hydrophobin into an amphipathic protein membrane mediates fungal attachment to hydrophobic surfaces. *EMBO Journal*, **13**: 5848–5855.
- Wösten HAB, Ruardy TG, van der Mei HC, Busscher HJ, Wessels JGH** (1995) Interfacial self-assembly of a *Schizophyllum commune* hydrophobin into an insoluble amphipathic membrane depends on surface hydrophobicity. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, **5**: 189–195.
- Wösten HAB, van Wetter M-A, Lugones LG, van der Mei HC, Busscher HJ, Wessels JGH** (1999) How a fungus escapes the water to grow into the air. *Current Biology*, **9**: 85–88.
- Wu T, Sharda JN, Koide RT** (2003) Exploring interactions between saprotrophic microbes and ectomycorrhizal fungi using a protein-tannin complex as an N source by red pine (*Pinus resinosa*). *New Phytologist*, **159**: 131-139.
- Wu T, Kabir Z, Koide RT** (2005) A possible role for saprotrophic microfungi in the N nutrition of ectomycorrhizal *Pinus resinosa*. *Soil Biology & Biochemistry*, **37**: 965-975.
- Yakovlev AY, Borovskii GB, Penzina TA, Petrov AN, Voynikov VK** (2000) The influence of subzero temperatures on mycelial growth and fruit bodies vitality of some higher xylophilic basidiomycetes. *Mikologiya I Fitopatologiya*, **34**: 56-62.
- Yan F, Zhu Y, Müller C, Zörb C, Schubert S** (2002) Adaptation of H<sup>+</sup>-pumping and plasma membrane H<sup>+</sup> ATPase activity in proteoid roots of white lupin under phosphate deficiency. *Plant Physiology*, **129**: 50-63.
- Yedidia I, Benhamou N, Chet I** (1999) Induction of defense response in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**: 1061-1070.
- Yu TE, Egger KN, Peterson LR** (2001) Ectendomycorrhizal associations - characteristics and functions *Mycorrhiza*, **11**.
- Yun W, Hall I** (2004) Edible ectomycorrhizal mushrooms: challenges and achievements. *Canadian Journal of Botany*, **82**: 1063-1073.
- Zadworny M, Werner A, Idzikowska K** (2004) Behaviour of the hyphae of *Laccaria laccata* in the presence of *Trichoderma harzianum* *in vitro*. *Mycorrhiza*, **14**: 401-405.
- Zakaria AJ, Boddy L** (2002) Mycelial foraging by *Resinicium bicolor*: interactive effects of resource quantity, quality and soil composition. *FEMS Microbiology Ecology*, **40**: 135.
- Zhang M, Cheung PCK, Zhang L** (2001) Evaluation of mushrooms dietary fibre (nonstarch polysaccharides) from sclerotia of *Pleurotus tuber-regium* (Fries) Singer as a potential antitumor agent. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **49**: 5059-5062.