

Micorrização “*in vitro*” de Germinantes de *Pinus pinaster*

Costa A.; Baptista P. & MARTINS A.

Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária, Quinta de Santa Apolónia, Apt.1
172, 5301 - 855 BRAGANÇA, Portugal.

Resumo. Em Portugal, as florestas de pinheiro bravo (*Pinus pinaster*) possuem grande importância económica, sobretudo nas regiões cujos solos apresentam baixa fertilidade. Contudo, nos últimos anos, a área de pinhal bravo tem vindo a diminuir, resultante essencialmente dos fogos florestais, originando um défice anual de matéria-prima para satisfazer as necessidades das indústrias da madeira.

A micorrização de plantas de pinheiro bravo apresenta-se como uma medida adequada para a revitalização do cultivo desta espécie, pelos enormes benefícios que advêm desta associação para ambos os intervenientes (planta e fungo). As principais vantagens para a planta traduzem-se num aumento da sua sobrevivência, sobretudo quando em condições adversas, e de crescimento, acrescendo o rendimento da floresta e antecipando receitas.

O presente trabalho pretende explorar os benefícios desta associação ao nível do crescimento de germinantes de *P. pinaster*, quando micorrizadas com dois fungos, *Pisolithus tinctorius* e *Amanita muscaria*. Neste sentido, acompanhou-se o processo de micorrização *in vitro* destes germinantes, e estudou-se o seu efeito no crescimento ao longo do tempo, através da avaliação da altura total das plantas, comprimento da parte aérea, comprimento da maior raiz e número de folhas. Avaliou-se igualmente, para cada um destes parâmetros, os acréscimos de crescimento ao fim do ensaio ($\Delta x/\Delta t$) bem como as taxas de crescimento relativo (TCR).

Verificou-se que, ambos os fungos promoveram um aumento do crescimento das plantas de pinheiro bravo face às controlo (não inoculadas). Contudo, o sistema estabelecido entre *P. pinaster* e *P. tinctorius* promoveu um maior crescimento da planta hospedeira comparativamente à associação *P. pinaster* e *A. muscaria*.

Os resultados aqui apresentados poderão abrir novas perspectivas para a utilização de fungos micorrízicos em inoculações controladas em viveiros ou florestações, permitindo uma resposta mais eficaz às necessidades actuais de mercado. Discute-se ainda o papel da micorrização de germinantes de pinheiro bravo com trabalhos realizados com outras espécies arbóreas.

Introdução

Pinus pinaster ocorre naturalmente nas regiões costeiras europeias e africanas, desde o mediterrâneo ocidental, até ao litoral atlântico de Portugal, Espanha e França. Na actualidade estende-se a outros países da União Europeia como a Bélgica, a Dinamarca e a Grécia e a outros Continentes através de acções de repovoamento, como a Austrália, Estados Unidos (Califórnia), Nova Zelândia e África do Sul (In Quinteiro, 2005).

Apesar das múltiplas discussões sobre a origem e carácter autóctone de *P. pinaster*, podemos afirmar que a sua distribuição espontânea actual se situa em territórios altamente humanizados desde tempos remotos, tendo este facto influenciado de forma determinante a conformação final da paisagem florística. A realização de repovoamentos fora e dentro da sua área de distribuição primitiva, os desbastes, o fogo e o pastoreio são responsáveis pela actual distribuição descontínua e fragmentada que *P. pinaster* apresenta (Gil *et al.*, 1990).

P. pinaster é uma espécie pioneira ou colonizadora de espaços vazios, ocupando as primeiras etapas da sucessão até formações mais complexas, devido ao seu reduzido nível de exigência e à sua capacidade de adaptação às variações de solo e clima. Estas escassas

exigências e a rapidez com que se desenvolve, permitem-lhe colonizar solos nus onde não foi possível instalarem-se outras espécies. Por este motivo, tem sido usado, com bons resultados, na fixação de dunas, na protecção do solo contra a erosão (Moore, 1988) e na recuperação de zonas florestais (Bragança & Havel, 1987).

Os povoamentos de pinheiro bravo formam um biótopo muito adequado para a produção micológica, sendo de particular importância os fungos micorrízicos de que dependem obrigatoriamente as plantas do género *Pinus*. São citadas mais de 300 espécies de fungos associados a povoamentos de *P. pinaster*, a maioria das quais são micorrízicas (Fernandez, 1994).

As aplicações práticas das micorrizas podem dividir-se em dois aspectos fundamentais: o melhoramento directo das plantas hospedeiras, através da melhoria das suas condições fisiológicas (sobrevivência ao transplante, aumento das taxas de crescimento, aumento da absorção de água e de nutrientes minerais, com consequente economia na fertilização, aumento da tolerância a agentes patogénicos, entre outros) e a produção de carpóforos de fungos comestíveis (Quinteiro, 2005).

Em relação ao primeiro aspecto, já é reconhecido que a micorrização deveria constituir um elemento de importância vital em operações de produção em viveiros florestais, pelo que também as operações que incidem negativamente na micorrização deveriam ser controladas (herbicidas, substratos artificiais sem inóculo, uso excessivo de fertilizantes p. ex.) (Quinteiro, 2005). A maioria dos fungos pioneiros utilizados em micorrização de espécies florestais em viveiros não têm qualquer valor económico em termos gastronómicos, mas exercem as suas funções ecológicas, dando vantagens adaptativas às plantas (*Pisolithus tinctorius*, *Laccaria laccata*, *L. bicolor*, *Cenococcum geophilum* e *Hebeloma crustuliniforme*). A produção de fungos comestíveis, por outro lado, está menos desenvolvida e vulgarizada e tem vindo a relacionar-se, sobretudo, com a produção de trufa negra (*Tuber melanosporum*) dada a sua valorização económica. Trabalhos com outras espécies têm vindo a ser desenvolvidos e têm um interesse e procura crescentes, como os pertencentes ao género *Boletus* (*B. edulis* (Zuccherelli, 1988), *B. aereus* (Ceruti *et al.*, 1985) e ao género *Lactarius* (*L. deliciosus* (Gracia *et al.*, 1993).

Em Portugal a micorrização continua a ser uma prática pouco utilizada, começando a haver um interesse progressivamente maior por esta tecnologia. A diminuição das áreas florestadas por *P. pinaster* tem vindo a ser drasticamente diminuída nos últimos anos, sendo necessário promover o seu repovoamento e o uso de práticas mais adequadas à produção e sobrevivência das plantas. A micorrização de *P. pinaster* faz parte de um projecto de inventariação de macrofungos em povoamentos desta e outras espécies florestais e/ou agro-florestais (*Quercus pyrenaica* e *Castanea sativa*) que pretende ainda estudar o efeito da micorrização de germinantes no seu crescimento e taxas de aclimação, assim como ensaiar condições de produção de inóculo para aplicação em larga escala. Os resultados aqui apresentados são resultados preliminares dos ensaios de micorrização de germinantes de *P. pinaster in vitro*, no primeiro ano de desenvolvimento do Projecto (AGRO 689 - “Demonstração do papel dos macrofungos na vertente agronómica, económica e ambiental no Nordeste Transmontano. Aplicação à produção de plantas de castanheiro, pinheiro e carvalho”).

Material e métodos

Material vegetal

As sementes de *P. pinaster*, foram postas a germinar em placas de Petri (14 cm de diâmetro), contendo meio Melin-Norkans modificado (MMN) e incompleto (sem

casaminoácidos e extracto de malte). Todo este processo decorreu em condições de assepsia, em câmara de fluxo laminar.

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

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

Cultura de fungos micorrízicos

Os fungos micorrízicos utilizados foram *Pisolithus tinctorius* e *Amanita muscaria* dada a larga gama de hospedeiros com que conseguem associar-se e ainda por se tratarem de fungos pioneiros na sucessão micorrízica.

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

Micorrização *in vitro*

A síntese micorrízica foi realizada em placas de Petri, contendo germinantes cuja raiz apresentava um comprimento médio de 4 cm, em condições de assepsia, na câmara de fluxo laminar. Perto da raiz de cada germinante foi colocado um inóculo de fungo *A. muscaria* ou *P. tinctorius*, com 0,8 cm de diâmetro, retirado da região periférica das culturas em crescimento activo.

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

Como controlo destes ensaios utilizaram-se germinantes que foram sujeitos às mesmas condições, mas que não foram colocadas em contacto com o fungo.

Observação do estado de micorrização das raízes

O desenvolvimento dos germinantes foi observado ao longo de 45 dias após inoculação do fungo *A. muscaria*, e ao longo de 9 dias após inoculação do fungo *P. tinctorius*. A observação do estado de micorrização das raízes ao longo do processo de micorrização *in vitro*, foi realizada para permitir comparar os resultados dos parâmetros em estudo com o desenvolvimento das micorrizas.

Durante o decorrer deste processo avaliaram-se, em cada uma das plantas germinantes, os seguintes parâmetros: o comprimento da parte aérea e da parte radicular, o comprimento máximo das plantas, o n.º de folhas, o diâmetro do fungo, os acréscimos diários ($\Delta x/\Delta t$) e as taxas de crescimento relativo (TCR), sendo $\text{TCR} = 1/x * \Delta x/\Delta t$.

Apresentação dos resultados

Os parâmetros analisados são expressos através da média de 30 plântulas seguida pelo desvio padrão (s).

Resultados

Os parâmetros, comprimento da parte aérea (**Figura 1**) e comprimento máximo das plantas (**Figura 3**), apresentaram valores superiores em plantas micorrizadas com *P. tinctorius* e *A. muscaria* face às não micorrizadas. Estes acréscimos foram notórios sobretudo a partir dos 9 dias após inoculação.

Pelo contrário, não se observaram acréscimos de crescimento ao nível do comprimento da maior raiz em plântulas inoculadas com *A. muscaria* e *P. tinctorius* (**Figura 2**), ao longo do tempo estudado, face às não micorrizadas.

Em relação ao número de folhas (**Figura 4**), registou-se um aumento acentuado nas plantas não micorrizadas comparativamente às micorrizadas, sobretudo até aos 30 dias após inoculação. A partir desta altura foram as plantas inoculadas com *P. tinctorius* e *A. muscaria* que apresentaram um maior número de folhas.

Ambos os fungos micorrízicos registaram um aumento de crescimento em diâmetro, após os 3 dias de inoculação, e mais acentuado a partir dos 9 dias (**Figura 5**).

O crescimento das raízes das plantas em caixa de Petri, com meio de cultura MMN incompleto, ocorre de duas formas (**Estampa 1a**): Parte das raízes cresce à superfície enquanto outras crescem mergulhadas no meio. Ambos os fungos (*A. muscaria* e *P. tinctorius*) se caracterizam por colonizar rapidamente as raízes das plantas, com concomitante desenvolvimento do micélio extrarradicular (**Estampa 1e, f**).

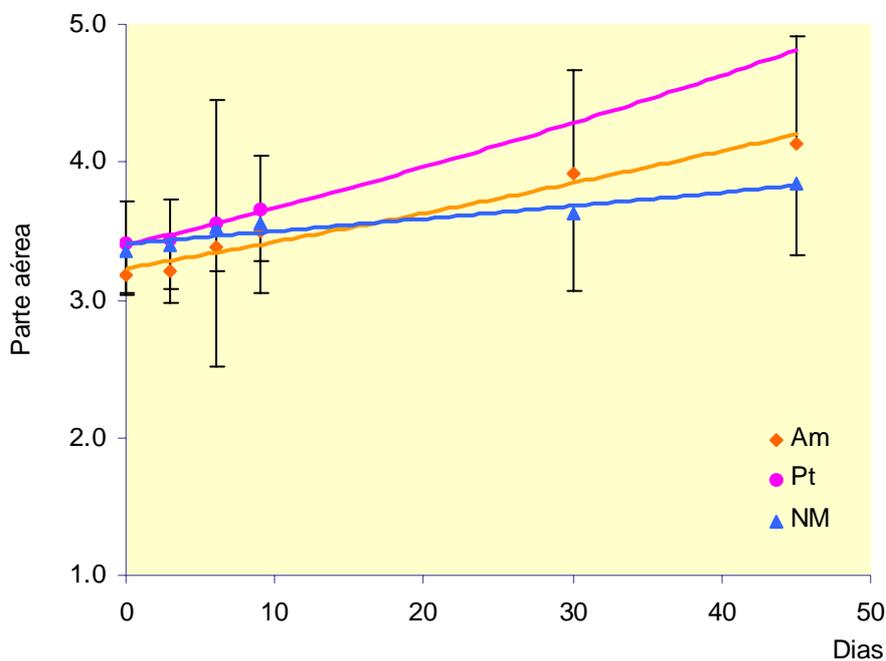


Figura 1- Representação gráfica da evolução do comprimento da parte aérea em cm de plantas micorrizadas com os fungos *A. muscaria* (Am), *P. tinctorius* (Pt) e não micorrizadas (NM), linhas de tendência e respectivos desvios padrões, dos 0 aos 45 dias após inoculação.

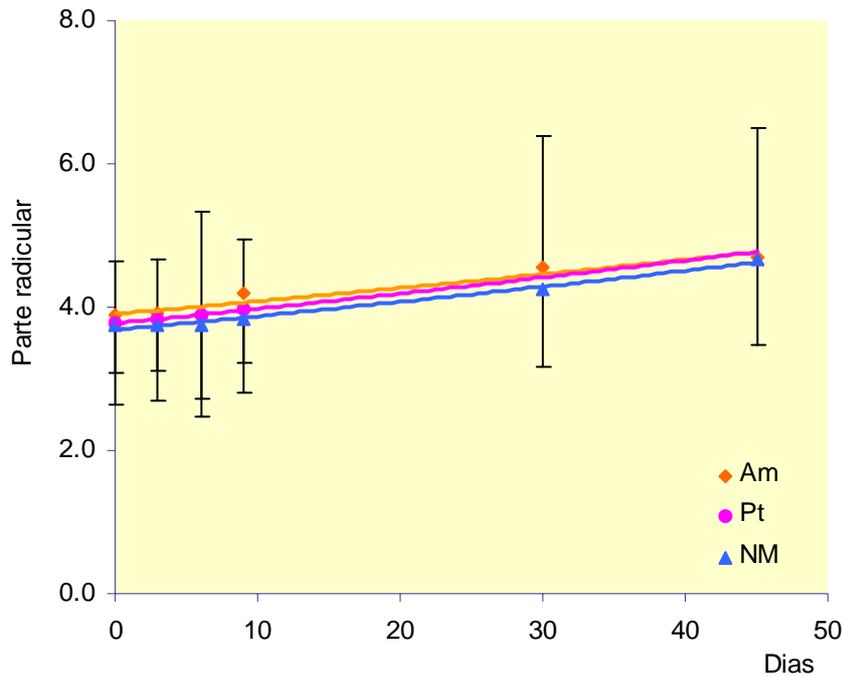


Figura 2- Representação gráfica da evolução do comprimento da parte radicular de plantas micorrizadas com os fungos *A. muscaria* (Am), *P. tinctorius* (Pt) e não micorrizadas (NM), linhas de tendência e respectivos desvios padrões, dos 0 aos 45 dias após inoculação.

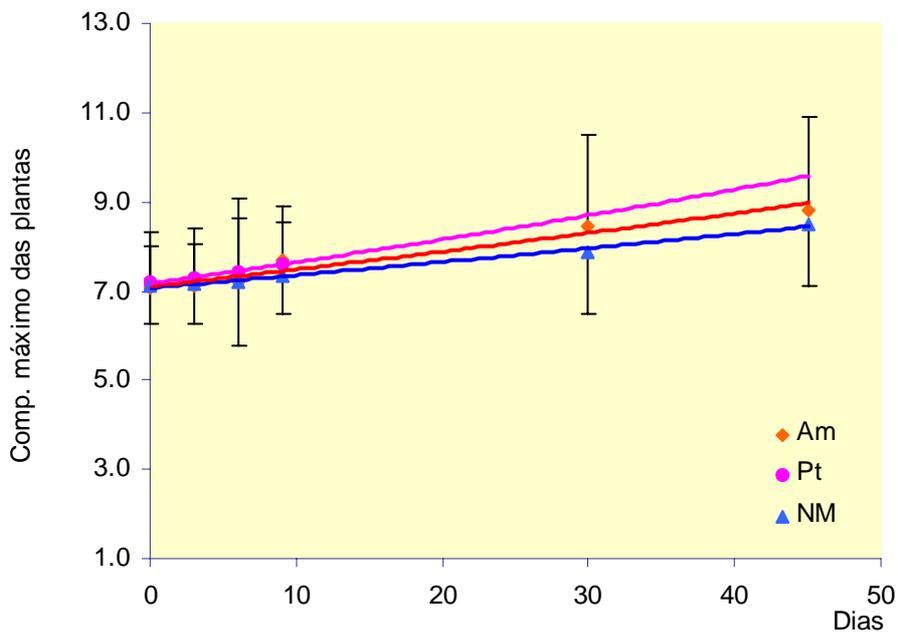


Figura 3- Representação gráfica da evolução do comprimento máximo (em cm) das plântulas micorrizadas com os fungos *A. muscaria* (Am), *P. tinctorius* (Pt) e não micorrizadas (NM), linhas de tendência e respectivos desvios padrões, dos 0 aos 45 dias após inoculação.

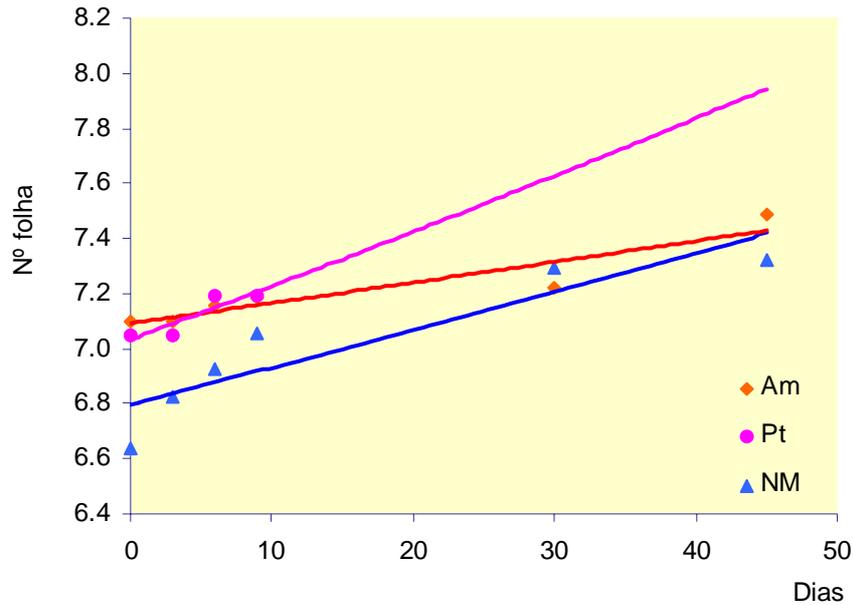


Figura 4- Representação gráfica da evolução do n.º de folhas de plantas micorrizadas com os fungos *A. muscaria* (Am), *P. tinctorius* (Pt) e não micorrizadas (NM), linhas de tendência e respectivos desvios padrões, dos 0 aos 45 dias após inoculação.

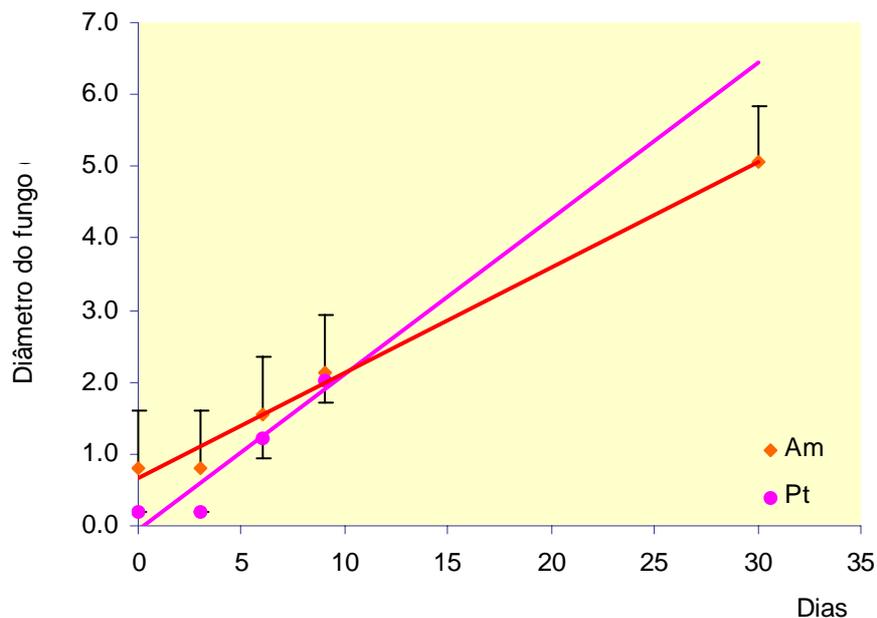


Figura 5- Representação gráfica da evolução do diâmetro dos fungos *A. muscaria* (Am) e *P. tinctorius* (Pt) (em cm) em co-cultura com as plantas, linhas de tendência e respectivos desvios padrões, dos 0 aos 45 dias após inoculação.

Os acréscimos dos parâmetros parte aérea e comprimento máximo das plantas ao fim do ensaio ($\Delta x/\Delta t$) foram superiores em plantas micorrizadas, sobretudo com *P. tinctorius*, comparativamente com as não micorrizadas. Os acréscimos dos parâmetros parte radicular e número total de folhas no final do ensaio foram apenas superiores nas plantas inoculadas com *P. tinctorius*. Foi também neste fungo que se observou um maior acréscimo de diâmetro ao fim do ensaio (**Quadro 1**).

ESTAMPA 1



Legenda:

- Aspecto das plântulas de *Pinus pinaster* aquando da inoculação com os fungos micorrízicos.
- Amanita muscaria* (à esquerda) e *Pisolithus tinctorius* (à direita) crescendo em meio de cultura MMN incompleto.
- Colocação de inoculo de *A. muscaria* junto das raízes de *P. pinaster*.
- Colocação de inoculo de *P. tinctorius* junto das raízes de *P. pinaster*.
- Plântulas de *P. pinaster* quinze dias após inoculação com *A. muscaria*.
- Plântulas de *P. pinaster* quinze dias após inoculação com *P. tinctorius*

A taxa de crescimento relativo (TCR) da parte aérea foi superior nas plantas inoculadas, sobretudo com *P. tinctorius*, face às controlo. Os valores de TCR obtidos para a parte radicular e comprimento máximo das plantas foram igualmente superiores nas plantas micorrizadas com *P. tinctorius*, comparativamente às não micorrizadas. Pelo contrário, nas plantas micorrizadas com *A. muscaria*, e para os parâmetros referidos, registaram-se valores inferiores às plantas controlo. O fungo *P. tinctorius* apresentou uma maior taxa de crescimento relativo face ao fungo *A. muscaria* (**Quadro 1**).

Quadro 1- Avaliação dos acréscimos diários ($\Delta x/\Delta t$) e taxas de crescimento relativo (TCR) em plantas micorrizadas com *A. muscaria* (Am), *P. tinctorius* (Pt) e plantas não micorrizadas (NM), ao longo de 45 dias de micorrização

	Parte aérea (pa)			Parte radicular (pr)			Comp. Máx. das plantas (cmp)			N.º de folhas			Diâmetro do fungo (df)	
	Am	Pt	NM	Am	Pt	NM	Am	Pt	NM	Am	Pt	NM	Am	Pt
$\Delta x/\Delta t$	0,021	0,026	0,011	0,018	0,021	0,020	0,039	0,047	0,031	0,009	0,016	0,015	0,142	0,202
TCR	0,005	0,007	0,003	0,004	0,005	0,004	0,004	0,006	0,004	0,001	0,002	0,002	0,028	0,100

Nota: $\Delta pa/\Delta t$, $\Delta pr/\Delta t$, $\Delta cmp/\Delta t$ e $\Delta df/\Delta t$ expressos em cm/dia. TCRpa, TCRpr, TCRcmp e TCRdf expressos em cm/cm dia.

Discussão e conclusões

Os resultados preliminares obtidos nos ensaios de micorrização *in vitro* de *P. pinaster* com *P. tinctorius* e *A. muscaria* mostram que, à semelhança do que se verificou com outras espécies, as plantas micorrizadas apresentam taxas de crescimento da parte aérea e número de folhas superiores às não micorrizadas, não se verificando concomitante crescimento do comprimento da raiz. Efectivamente, nalguns casos verifica-se mesmo um decréscimo do comprimento da maior raiz (Martins *et al.*, 1996, Martins, 2004). Em plântulas micropropagadas de *Betula* (Grellier *et al.*, 1984), *Populus* (Heslin & Douglas, 1986) e *Eucalyptus* (Poissonier, 1991), micorrizadas *in vitro*, foi igualmente observado um aumento do crescimento comparativamente ao controlo.

Os aumentos de crescimento de plantas micorrizadas evidenciam uma maior capacidade dos fungos em cultura para disponibilizarem os nutrientes minerais presentes no meio, dado que teoricamente todas as sementes teriam reservas semelhantes no respectivo endosperma.

A maior capacidade de crescimento de *P. tinctorius* comparativamente com *A. muscaria* confirma a sua conhecida capacidade para micorrização em condições *in vitro*, posto que, com o mais rápido desenvolvimento, mais facilmente atinge as raízes das plantas e inicia o processo de associação, conseguindo, desta forma, um benefício mais precoce para as plantas.

Dos resultados obtidos podemos afirmar que há indícios da possibilidade de obter benefícios da micorrização controlada de germinantes de *P. pinaster* em termos de crescimento da parte aérea das plantas, sendo possível micorrizar as plantas com ambos os fungos testados (*P. tinctorius* e *A. muscaria*). A repetição dos ensaios *in vitro* e *ex vitro*, com quantificação dos parâmetros para os mesmos tempos de ensaio, estão em curso no sentido de avaliar as potenciais vantagens da micorrização prévia de plantas.

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

Referências

- Bragança L., Havel, J.J. 1987: Potencial of *Pinus pinaster*, *P. radiata* nad *P. elliottii* to rehabilitate dieback sites. Department of conservation and land management. Western Austrália. Research Paper. 2: 1-11.
- Ceruti, A., Tosí, M., Reitano, G. 1985: Síntesi micorrizica tra *Boletus aereus* e *Castanea sativa*. Allionia, 27: 5-9.
- Fernandez Toirán, M. 1994: Estudio de la producción micológica actual en la Comarca de Pinares de Soria y ensayo de técnicas de mejora de la misma. Tese de doutoramento. Faculdade de Biología. Universidade de Santiago de Compostela. 300pp.
- Gil, L., Gordo, J., Alia, R., Catalán, G., Pardos, J. A.. 1990: *Pinus pinaster* Ait. En el paisaje vegetal de la Península Ibérica. Ecologia. Fora de Série nº1. 469 – 495.
- Gracia, E., Martinez, O., Barceló, M., Ximeno, F. 1993: Test de micorrización para pinos productores de niscalos. Análisis cualitativo. Actas del Congreso Forestal Español. Pontevedra (Espanha) III: 369-373.
- Grellier B., Letouze R. & Strullu D., 1984. Micropropagation of birch and mycorrhizal formation in vitro. New Phytologist, 97: 591-599.
- Heslin M & Douglas G., 1986. Effects of ectomycorrhizal fungi on growth and development of poplar plants derived from tissue culture. Scientia Horticulturae, 30: 143-149.
- Martins A, 2004: Micorrização controlada de *Castanea sativa* Mill.: Aspectos fisiológicos da micorrização in vitro e ex vitro. Dissertação de doutoramento em Biotecnologia Vegetal. Faculdade de Ciências de Lisboa. Universidade Clássica de Lisboa. 506 pp.
- Martins A, 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.
- Moore, R. 1988: Aspects of agroforestry research in Western Austrália. The International Forestry Conference for the Australian Bicentenary 1988. Ed. R.L. Newman. Australian Forest Development Institute. Vol. II: 1-9.
- Poissonnier M., 1991. Etude expérimentale de la mycorrhization in vitro de clones d'eucalyptus. IUFRO, AFOCEL, 59-90 pp.
- Quinteiro, S.L. 2005: Respuesta de siete orígenes ibéricos de *Pinus pinaster* Aiton frente a la inoculación en vivero con *Pisolithus tinctorius* y *Paxillus involutus*. Tese de doutoramento. Universidade de Santiago de Compostela. 218pp.
- Zuccherelli, G. 1988: Prime esperienze sulla produzione di piante forestali micorrizzate co *Boletus edulis*. Monti e Boschi. 3:11-14.