



# **Caracterização Química de Fungos Micorrízicos e Plantas de *Pinus pinaster* ao Longo dos Primeiros Estádios de Simbiose**

**Márcio Soares Carochó**

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança  
para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia*

Orientado por

**Anabela Rodrigues Lourenço Martins**

**Isabel Cristina Fernandes Rodrigues Ferreira**

**Bragança  
2011**

“Whatever the mind can conceive and believe, the mind can achieve.”

**-Napoleon Hill**

Este trabalho insere-se no projecto de investigação PTDC/AGR-ALI/110062/2009, financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT, Portugal) e pelo Programa COMPETE/QREN/EU.

**Aos meus avôs,**  
**Latino Carochó (28/09/1915 – 27/12/2007)**  
**José Soares de Castro (20/01/1934 – 30/07/2010)**

**À minha mãe...**



## AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras, a Doutora Anabela Martins e a Doutora Isabel Ferreira, por aceitarem orientar o meu trabalho, pela força e conhecimento que sempre me transmitiram, pela disponibilidade, pela confiança que depositaram em mim e sobretudo pela amizade. Agradeço tudo o que fizeram para que eu evoluísse como aluno e pessoa. Serão sempre um exemplo de justiça, coragem, competência, idoneidade e integridade que tentarei seguir.

Ao Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada, da Escola Superior Agrária de Bragança, a todos os investigadores que lá trabalham, pela ajuda que me deram durante a realização do meu trabalho e pela convivência que proporcionaram, que me ajudou nos dias mais complicados.

Ao Laboratório de Biologia e Biotecnologia, da Escola Superior Agrária de Bragança, a todos os docentes e funcionários que lá trabalham, obrigado pela disponibilidade.

À Doutora Lillian Barros e Doutor João Barreira pelo amável apoio, acompanhamento e esclarecimentos durante a minha estadia no LQBA e por ajudarem de um modo altruísta e despretensioso.

Aos meus amigos de Bragança e de Águeda. Aqueles com quem pude durante este tempo desabafar, conversar, rir e conviver. Aqueles que sempre tiveram uma palavra amiga, aqueles que nunca me viraram as costas e que, mesmo sem estarem sempre presentes, conseguiram transmitir força e coragem. Um agradecimento especial ao Paulo Antunes, pois um bom amigo é como um irmão, está lá nos melhores e piores momentos.

À minha namorada Filipa, pela pessoa que é. Não conheço ninguém que consiga ser ao mesmo tempo tudo aquilo que ela é. A tua competência e dedicação foram uma preciosa ajuda nesta aventura. O teu carinho e compreensão ajudaram-me a lidar com as frustrações e dificuldades que esta tese exigiu, e finalmente o teu amor, que foi a mão

que guiou este trabalho. Não é possível exprimir em palavras a gratidão por tudo em que me ajudaste.

À minha tia Sandra, e primas Lia e Lara, por me fazerem acreditar que os sonhos são alcançáveis e que a família é uma força inesgotável.

Às minhas avós, Maria Augusta Carochó e Fernanda Castro, tanto pelo apoio emocional como financeiro. Sem vocês acho que não seria possível chegar aqui. Espero que ao atingir esta fase da minha vida seja alguém de quem vocês se possam orgulhar. Obrigado por serem um exemplo de vida.

Ao meu pai pelos bons conselhos e palavras de coragem. Apesar de distante, agradeço todos os valores e ensinamentos que me transmitiste ao longo dos tempos. Um pai é um herói para o filho, e tu não foste exceção.

À minha irmã pela maneira irreverente como sempre me transmitiu o seu apoio. Obrigado por me ajudares a chegar a este patamar com mais ânimo e mesmo estando longe conseguiste estar perto.

Aos meus avôs, Latino Carochó e José Castro, a quem dedico esta tese. Apesar de já terem partido, continuam vivos no meu coração, e assim vão permanecer. Em vida foram sempre uma fonte de inspiração inesgotável e um exemplo a seguir. Obrigado por me fazerem gostar do verde, das plantas, dos animais e do meio natural. Obrigado pelos princípios que me transmitiram. Espero poder honrar-vos todos os dias.

À minha mãe, a quem também, e em especial, dedico esta tese. Obrigado pelo amor, pela coragem, pelos inúmeros sacrifícios, pela ajuda, pela presença e pelos valores que me inculcaste. Sem ti nunca teria conseguido chegar até aqui e se o conseguí a ti o devo. Não chegavam duzentas páginas para exprimir o meu agradecimento. Obrigado por sempre me apoiares, por acreditares em mim e por teres conseguido ultrapassar todas as dificuldades e adversidades para que eu conseguisse alcançar esta etapa. A tua força, tenacidade, perseverança, firmeza e ternura são exemplos que tentarei seguir. Mãe, amo-te. Obrigado!

**ÍNDICE GERAL**

<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>II</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>X</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XIV</b>
<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Os fungos .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Filo Basidiomycota .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3. <i>Paxillus involutus</i>, <i>Pisolithus arhizus</i>.....</b>	<b>4</b>
<b>1.4. <i>Pinus pinaster</i> .....</b>	<b>6</b>
<b>1.5. Micorrizas e micorrização .....</b>	<b>7</b>
<b>1.6. Stresse Oxidativo .....</b>	<b>12</b>
<b>1.7. Enquadramento do trabalho .....</b>	<b>14</b>
<b>1.8. Objectivos .....</b>	<b>15</b>
<b>II. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1. Material biológico .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2. Germinação das sementes de <i>Pinus pinaster</i> .....</b>	<b>17</b>
<b>2.3. Produção de micélio <i>in vitro</i>.....</b>	<b>18</b>
<b>2.4. Indução da micorrização <i>in vitro</i> .....</b>	<b>18</b>
<b>2.5. Preparação das amostras .....</b>	<b>21</b>
<b>2.6. Padrões e Reagentes .....</b>	<b>21</b>
<b>2.7. Determinação da actividade antioxidante .....</b>	<b>21</b>
2.7.1. <i>Preparação dos extractos metanólicos.....</i>	<i>21</i>
2.7.2. <i>Ensaio da actividade captadora de radicais DPPH .....</i>	<i>22</i>
2.7.3. <i>Poder redutor .....</i>	<i>23</i>
2.7.4. <i>Inibição da descoloração do <math>\beta</math>-caroteno.....</i>	<i>24</i>
2.7.5. <i>Inibição da peroxidação lipídica através do ensaio das espécies reactivas do ácido tiobarbitúrico (TBARS).....</i>	<i>26</i>
<b>2.8. Determinação de compostos antioxidantes.....</b>	<b>27</b>
2.8.1. <i>Fenóis totais .....</i>	<i>27</i>
2.8.2. <i>Determinação de tocoferóis.....</i>	<i>28</i>
2.8.3. <i>Determinação de açúcares livres .....</i>	<i>30</i>
<b>2.9. Análise estatística.....</b>	<b>32</b>
<b>III. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>IV. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>50</b>

<b>4.1. Conclusões .....</b>	<b>50</b>
<b>4.2. Perspectivas futuras.....</b>	<b>52</b>
<b>V. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>54</b>
<b>VI. ANEXOS .....</b>	<b>64</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Ilustração da manutenção do estado dicariótico através de ansas de ligação. A; Hifa dicariótica com dois núcleos de diferentes tipos. B; Desenvolvimento de uma hifa secundária que cresce de forma inversa contendo um dos núcleos. C; após divisão sincronizada de ambos os núcleos, um dos núcleos continua a dirigir-se para a hifa principal. D; desenvolvimento de dois septos, um que separa a hifa principal da secundária e outro que divide a hifa principal em dois. E; a hifa secundária funde-se com a principal, e o núcleo migra para esta. Ambas as células são agora dicarióticas. F; ilustração provável da divisão nuclear sem recurso a uma ansa de ligação resultando numa hifa dicariótica como em A, mas em que cada célula septada é monocariótica (Carlile et al., 2001)..... 4

**Figura 2.** Representação esquemática dos 6 tipos diferentes de micorrizas, bem como as principais vias de absorção de nutrientes, em que “C” representa o carbono, “N” o azoto, “P” o fósforo, “Org” as formas orgânicas, “Zn” o zinco, “Ca” o cálcio e “Fe” o ferro D.J. Read (2002). ..... 8

**Figura 3.** Esquema de uma interacção micorrízica típica entre *Pinus pinaster* e o fungo *Hebeloma cylindrosporum*, evidenciando as estruturas e processos de micorrização típicos de fungos do filo Basidiomycota (Müller et al., 2007). ..... 11

**Figura 4.** Diagrama das causas, alvos e consequências do stresse oxidativo levado a cabo por radicais livres (Ferreira et al., 2009). ..... 12

**Figura 5.** Mecanismo de reacção das espécies reactivas de oxigénio, com início no dióxigénio, e por captação de um electrão livre para preencher a orbital exterior forma-se sucessivamente o radical peróxido, o peróxido de hidrogénio, a água, o radical hidroxilo, até que esta oxidação acaba na formação de uma molécula de água (Apel & Hirt, 2004). ..... 13

**Figura 6.** Estampa do material biológico. A. Corpo de frutificação de *Paxillus involutus*. B. Corpo de frutificação de *Pisolithus arhizus*; C. Micélio de *Paxillus involutus*; D. Micélio de *Pisolithus arhizus*; E. Germinante de *Pinus pinaster*; F. Germinantes de *Pinus pinaster* após 3 semanas; G. *Paxillus involutus* + *Pinus pinaster* no momento de inoculação; H. *Pisolithus arhizus* + *Pinus pinaster* no momento da inoculação. .... 20

**Figura 7.** Esquema de redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo). ..... 22



<b>Figura 8.</b> Reacções envolvidas no ensaio de determinação do poder redutor das amostras.....	24
<b>Figura 9.</b> Reacções envolvidas no ensaio de determinação do $\beta$ -caroteno. ....	25
<b>Figura 10.</b> Reacção envolvida no ensaio TBARS. ....	26
<b>Figura 11.</b> Reacções envolvidas na actividade antioxidante dos tocoferóis.....	28
<b>Figura 12.</b> Estrutura química genérica dos tocoferóis ( $R^1=R^2=CH_3$ , $\alpha$ -tocoferol; $R^1=CH_3$ , $R^2=H$ , $\beta$ -tocoferol; $R^1=H$ , $R^2=CH_3$ , $\gamma$ -tocoferol; $R^1=R^2=H$ , $\delta$ -tocoferol).....	29
<b>Figura 13.</b> Estrutura química da trealose (A) constituído por duas unidades de D-glucose, açúcar não redutor, e do manitol (B) açúcar-álcool derivado de D-manose. ...	30
<b>Figura 14.</b> Estrutura química da glucose (A), açúcar redutor, da frutose (B) açúcar redutor e sacarose (C), constituído por uma unidade de D-glucose e uma de frutose, açúcar não redutor. ....	31
<b>Figura 15.</b> Crescimento radial de <i>Pisolithus arhizus</i> e <i>Paxillus involutus</i> . ....	34
<b>Figura 16.</b> Perfil de tocoferóis do micélio de <i>Pisolithus arhizus</i> (-) e <i>Paxillus involutus</i> (--) em co-cultura com raízes de <i>Pinus pinaster</i> durante 24h (1- $\alpha$ -tocoferol; 2- BHT; 3- $\beta$ -tocoferol; 4- $\gamma$ -tocoferol; 5- $\delta$ -tocoferol; 6- PI).....	41
<b>Figura 17.</b> Perfil de açúcares do micélio de <i>Pisolithus arhizus</i> (-) e <i>Paxillus involutus</i> (-) em co-cultura com raízes de <i>Pinus pinaster</i> durante 72 horas (1- glucose; 2- manitol; 3- trealose; 4- PI). ....	44
<b>Figura 18.</b> Médias marginais estimadas para o conteúdo em açúcares totais nos diferentes elementos da co-cultura (CE). ....	44
<b>Figura 19.</b> Análise canónica dos períodos de co-cultura de <i>Pisolithus arhizus</i> com base em todos os parâmetros. ....	46
<b>Figura 20.</b> Análise canónica dos períodos de co-cultura de <i>Paxillus involutus</i> com base em todos os parâmetros. ....	47
<b>Figura 21.</b> Análise canónica dos elementos da co-cultura de <i>Pisolithus arhizus</i> com <i>Pinus pinaster</i> baseado nos valores de $EC_{50}$ da actividade antioxidante. Devido à proximidade das de ambos os elementos, uma escala de expansão foi adicionada.....	48
<b>Figura 22.</b> Análise canónica dos elementos da co-cultura de <i>Paxillus involutus</i> com <i>Pinus pinaster</i> baseado no conteúdo em açúcares.....	49
<b>Figura 23.</b> Médias marginais estimadas para os fenóis nos diferentes elementos da cultura (CE) durante os períodos de cultura (CP).....	50

**Figura 24.** Representação de micorrizas. A. Micorriza de *Pisolithus arhizus*. B. Micorriza de *Paxillus involutus*. C. Raiz de *Pinus pinaster* com micorrizas de *Pisolithus arhizus*. D. Raiz de *Pinus pinaster* com micorrizas de *Paxillus involutus*..... 52

**ÍNDICE DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Classificação das espécies em estudo. ....	17
<b>Tabela 2.</b> Composição do meio de cultura Melin-Norkrans; pH 6,6. ....	18
<b>Tabela 3.</b> Actividade antioxidante (valores de EC <sub>50</sub> ) e conteúdo em fenóis para a micorrização entre <i>Pisolithus arhizus</i> e a raiz de <i>Pinus pinaster</i> . ....	35
<b>Tabela 4.</b> Actividade antioxidante (valores de EC <sub>50</sub> ) e conteúdo em fenóis para a micorrização entre <i>Paxillus involutus</i> e a raiz de <i>Pinus pinaster</i> . ....	36
<b>Tabela 5.</b> Valores de EC <sub>50</sub> da actividade antioxidante (mg/ml), conteúdo em fenóis (mg/ml) obtidos dos elementos da cultura (CE). Os resultados são apresentados como média ±SD (n=27, para cada período de co-cultura (CP); n=36 para cada elemento da cultura). ....	37
<b>Tabela 6.</b> Resultados globais dos tocoferóis para a micorrização entre <i>Pisolithus arhizus</i> e <i>Pinus pinaster</i> . ....	39
<b>Tabela 7.</b> Resultados globais dos tocoferóis para a micorrização entre <i>Paxillus involutus</i> e <i>Pinus pinaster</i> . ....	39
<b>Tabela 8.</b> Conteúdo em tocoferóis (mg/100 g dw) nos elementos da cultura (CE). Os resultados são apresentados em média±SD (n=27, para cada período de co-cultura (CP); n=36 para cada elemento da cultura). ....	40
<b>Tabela 9.</b> Resultados globais dos açúcares para a micorrização entre <i>Pisolithus arhizus</i> e <i>Pinus pinaster</i> . ....	42
<b>Tabela 10.</b> Resultados globais dos açúcares para a micorrização entre <i>Paxillus</i> e <i>Pinus pinaster</i> . ....	42
<b>Tabela 11.</b> Teor em açúcares (g/100 g dw) nos elementos da cultura (CE). Os resultados são apresentados em média±SD (n=27, para cada período de co-cultura (CP); n=36 para cada elemento da cultura). ....	43

**ABREVIATURAS**

A <sup>·</sup>	Radical livre
Abs	Absorvância
ACR	Actividade captadora de radicais
ANOVA	Análise de Variância
AH	Molécula antioxidante
BHT	2,6-Di- <i>terc</i> -butil-4-metilfenol
CE	Elemento de cultura
CENASEF	Centro Nacional de Sementes Florestais
CP	Período de cultura
DAD	Detector de díodos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	Radical 2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo
Dw	Massa seca
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EC <sub>50</sub>	Concentração de extracto correspondente a 50% de actividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no caso do ensaio do poder redutor
Fw	Massa fresca
GLM	Modelo linear generalizado
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
L <sup>·</sup>	Radical lipídico alquilo
LDA	Análise discriminante linear
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LH	Radical lipídico alquilo reduzido
LOO <sup>·</sup>	Radical lipídico peroxilo
MDA	Malondialdeído
MMN	Meio de cultura Melin-Norkrans
MS	Espectrometria de massa
m/v	Relação massa/volume
nd	Não detectado
PI	Padrão interno

PUFA	Ácidos gordos polinsaturados
RI	Detector de índice de refração
RNS	Espécies reactivas de azoto
ROO <sup>·</sup>	Radical peroxilo
ROOH	Hidroperóxido
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
Rpm	Rotações por minuto
SD	Desvio padrão
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Espécies reactivas do ácido tiobarbitúrico
UV	Ultravioleta
v/v	Relação volume/volume

## RESUMO

A simbiose ectomicorrízica entre fungos e as raízes de algumas espécies de plantas pode ter efeitos importantes a nível da produção de compostos antioxidantes em ambos os simbioses, como resultado de um processo de reconhecimento mútuo e como resposta à interacção.

Neste trabalho, estudaram-se os efeitos do período de co-cultura entre germinantes da espécie florestal *Pinus pinaster* e as espécies de fungos ectomicorrízicos *Pisolithus arhizus* e *Paxillus involutus* nas propriedades antioxidantes e na produção de compostos com igual actividade (fenóis, tocoferóis e açúcares) dos simbioses. Assim, avaliaram-se os primeiros estádios do processo de micorrização (6, 24 e 72h), testando-se todos os elementos (raízes, micélio e meio de cultura) de modo a compreender a resposta de cada um dos parceiros à simbiose.

As propriedades antioxidantes foram determinadas através da realização de ensaios de avaliação da actividade captadora de radicais livres 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH), poder redutor, inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno e inibição da peroxidação lipídica pela diminuição da formação de espécies reactivas do ácido tiobarbitúrico (TBARS). As concentrações em fenóis, tocoferóis e açúcares foram obtidas pelo ensaio colorimétrico *Folin Ciocalteus*, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a um detector de fluorescência e por HPLC acoplada a um detector de índice de refração (RI), respectivamente.

Os efeitos observados foram interpretados do ponto de vista ecológico (compreensão dos efeitos da associação micorrízica na produção de antioxidantes, nomeadamente a percepção se este mutualismo potencia a actividade antioxidante ou se, por outro lado, a inibe), mas também do ponto de vista medicinal (utilização das associações simbióticas para obtenção de antioxidantes).

O fungo *Pisolithus arhizus* provou ser mais compatível com *Pinus pinaster* do que o *Paxillus involutus*, dado que a actividade antioxidante deste aumentou entre as 48 e as 72h, enquanto no *Pisolithus arhizus* essa actividade decresceu no mesmo período de tempo (podendo evidenciar menos stresse oxidativo). Apesar da espécie *Paxillus involutus* parecer ser menos indicada para programas de reflorestação que envolvam processos de micorrização, esta poderá ser uma fonte de compostos bioactivos pois revelou uma maior produção de compostos antioxidantes nos primeiros estádios da

simbiose. De facto, a concentração máxima de fenóis foi obtida após as 6h. Desta forma, caso a finalidade seja a produção de compostos bioactivos, a co-cultura deverá ser interrompida neste período.

## ABSTRACT

Ectomycorrhizal symbiosis between fungi mycelia and the roots of some plants could have important effects in the levels of antioxidants of both parts.

In the present work, the effects of co-culture period (6, 24 and 72h) in the antioxidant properties and antioxidants (phenolics, tocopherols and sugars) production during early steps of *in vitro* mycorrhization (*Pisolithus arhizus*-*Pinus pinaster* and *Paxillus involutus*-*Pinus pinaster*) were evaluated. The studied parameters were determined in each culture element (root, mycelium and medium) in order to understand the response of each partner to the symbiotic association.

The antioxidant properties were determined by assays evaluating the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals scavenging activity, reducing power,  $\beta$ -carotene bleaching inhibition and lipid peroxidation inhibition by the decrease in tiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The concentrations in phenolics, tocopherols and sugars were obtained by *Folin Ciocalteus* colorimetric assay, high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to a fluorescence detector and HPLC coupled to a refraction index detector (RI), respectively.

The observed effects were analyzed in the ecological (comprehension of the mycorrhizal association effects in the antioxidants production, understanding if the mutualism stimulates or inhibits the antioxidant activity) and medicinal (use of symbiotic associations to obtain antioxidants) perspectives.

*Pisolithus arhizus* proved to be more compatible with *Pinus pinaster* than *Paxillus involutus*, since the antioxidant activity in the latter species increased from 48 to 72h, while *Pisolithus arhizus* antioxidant properties decreased at the same period (indicative of less oxidative stress). Although *Paxillus involutus* proved to be less suitable to be included in forestation programs using mycorrhization processes, it revealed a higher potential for bioactive compounds production in the early steps of symbiosis. A maximal value of phenolics content was obtained after the first 6h, and, therefore, considering bioactive compounds production purposes, the co-culture should be stopped at that time.



## I. INTRODUÇÃO

### 1.1. Os fungos

Existem cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos na Natureza, o que os torna o segundo maior grupo de seres vivos a seguir aos insectos. Existem fungos no gelo Antártico, nas regiões tropicais, nas regiões temperadas e a grandes latitudes a Norte. Eles colonizam solos, águas, rochas e água do mar (Feofilova, 2001).

Os fungos são heterotróficos (não realizam fotossíntese) alimentando-se por absorção (digestão extracelular ou simbiose) através de estruturas denominadas por hifas. Estas estruturas são filamentos que compõem o fungo e o seu conjunto denomina-se por micélio. A parede celular é composta por glucanos e quitina. A nível nuclear, os fungos são eucariotas uni ou multinucleados, sendo o talo homo ou heterocariótico, haplóide, dicariótico ou diplóide. O ciclo de vida é geralmente complexo, possuindo reprodução sexuada, por gemulação ou assexuada. Os propágulos são geralmente esporos microscópicos produzidos em grandes quantidades, provenientes de esporocarpos micro ou macroscópicos. Assim, os fungos são ubíquos em superfícies terrestres e em água doce, sendo menos frequentes em ambientes marinhos. Ecologicamente são importantes, desempenhando funções sapróbias (degradação de matéria orgânica), parasitárias (parasitas de outros seres vivos) e mutualistas (associação em que ambas as espécies tiram proveito da relação estabelecida) (Webster & Weber, 2007).

Os fungos sapróbios, ao contrário dos mutualistas e parasitas alimentam-se a partir de matéria morta. São responsáveis pela transformação de componentes orgânicos de plantas mortas em inorgânicos, nomeadamente fósforo, potássio e carbono, sendo este o mais importante, já que a sua fixação faz parte do ciclo do carbono. As bactérias também têm esta capacidade degradativa, mas os fungos são mais eficientes devido à sua forma, modo de crescimento (radial), capacidade de degradação das suas enzimas e do seu metabolismo (Carlile et al., 2001).

Vários organismos vivem em contacto com outras espécies e deles obtêm nutrientes ou proveito de uma outra forma. O micólogo e patologista vegetal do século XIX, De Bary, defendeu que estas relações são simbióticas, que podem ser parasíticas, quando apenas uma espécie beneficia em prejuízo da outra, e mutualistas quando ambas

beneficiam com a simbiose (Carlile et al., 2001). Em 2008, a simbiose foi descrita como sendo uma associação entre dois ou mais organismos, que viviam numa relação estreita. Esses organismos são denominados por simbiontes, e são altamente dependentes um do outro. Um dos simbiontes pode beneficiar, ser prejudicado ou até não ser afectado de todo pela associação, denominando-se mutualismo, parasitismo e comensalismo respectivamente (Aydt et al., 2008). Os fungos podem estabelecer estas relações com animais, plantas e mesmo outros fungos. No caso dos animais, existem relações de parasitismo com quase todas as espécies, tais como micoses, micotoxicoses e alergias; por outro lado, existem casos de mutualismo, por exemplo os microfungos que vivem no rúmen de determinados animais, em que os animais fornecem celulose aos fungos e estes degradam-na em nutrientes capazes de serem assimilados por estes. Este tipo de simbioses também ocorre com as plantas. Os fungos parasitas podem invadir as plantas de duas formas: por introdução de um esporo em feridas ou por penetração do tecido através das hifas. Os mecanismos de penetração variam de acordo com as espécies micológicas, mas quase todas formam rizomorfos (agregados de hifas com aspecto de raiz). A penetração dá-se por destruição de células com enzimas excretadas pelos fungos ou por introdução das hifas nas células ou espaços intercelulares do hospedeiro. A capacidade de infecção depende sempre da capacidade de resposta da planta. No caso das associações mutualistas entre fungos e plantas, há também penetração pelas hifas, contudo não há destruição de células, logo a planta reconhece o fungo como mutualista desactivando os seus mecanismos de defesa (Carlile et al., 2001).

Antes de 1969 os fungos eram considerados plantas devido à sua forma e ao facto de não apresentarem mobilidade, até que Whittaker criou o reino Fungi (Bowman et al., 1992). Em 1998, surge uma nova classificação proposta por T. Cavalier-Smith, que separou o mundo vivo em seis reinos (Animalia, Bacteria, Chromista, Fungi, Plantae e Protozoa) e na qual os fungos voltaram a ser um reino independente, apesar de terem sido retirados organismos do reino Fungi original para outros reinos, de entre os quais o Chromista (Cavalier-Smith, 1998).

Actualmente, após um entendimento da maior parte da comunidade micologista mundial e recorrendo às aplicações da biologia molecular determinou-se que o reino Fungi fosse dividido em 7 filos (Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Neocallimastigomycota e Microsporidia) 10 subfilos, 35 classes, 12 subclasses e 129 ordens. O filo Microsporidia, que contém

fungos parasitas de animais e protistas, foi introduzido por Hibbett, que referiu serem ainda necessários mais estudos para se poder confirmar se devem ter um filo próprio (Hibbett et al., 2007).

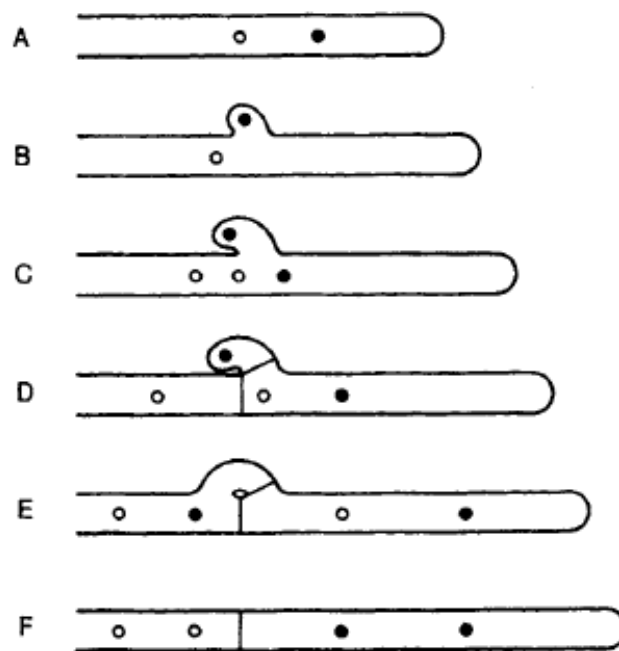
Os fungos possuem grande importância económica, sendo importantes na indústria fermentativa, seja em laboratórios ou na produção de bebidas fermentadas; são importantes na produção de enzimas e metabolitos primários (ácido cítrico) e secundários (penicilina) e possuem igualmente impacto na indústria alimentar, sendo o *Agaricus bisporus* o cogumelo mais consumido em todo o mundo. Mesmo os fungos microscópicos são importantes, quer nas utilizações referidas anteriormente, quer na indústria panificadora, de lacticínios e noutras vertentes da Biotecnologia. O Reino Fungi além de ser fundamental no ciclo natural do planeta, é também causador de grandes perdas económicas. Os sapróbios destroem madeira, combustível, alimentos e produtos processados. Em relação aos parasitas, causam grandes perdas em colheitas, bem como doenças em seres humanos e animais (Carlile et al., 2001).

## 1.2. Filo Basidiomycota

O filo Basidiomycota é composto por cerca de 30000 espécies. Grande parte dos cogumelos comestíveis e tóxicos pertencem a este grupo constituído por espécies terrestres, aquáticas e também espécies microscópicas que parasitam plantas (Webster & Weber, 2007). As ordens mais estudadas deste filo são as dos *Agaricales*, *Boletales*, *Poriales*, *Schizophyllales*, *Lycoperdales*, *Auriculariales* e *Tremellales* (Carlile et al., 2001). Morfologicamente, a estrutura resultante da reprodução sexuada, que define este sub-reino é o basídeo, uma célula cilíndrica e não septada na maioria das espécies, podendo sofrer variações consoante o género. Esta estrutura dá origem aos esporos – basidiósporos. Quase todas as espécies produzem quatro basidiósporos; contudo existem espécies que podem produzir, um, dois ou até nove.

O ciclo de vida dos fungos deste filo começa com a libertação dos basidiósporos. A sua dispersão é geralmente levada a cabo pelo vento, água ou animais. A germinação dá-se num ambiente favorável da rizosfera da planta hospedeira e é desencadeada por uma série de processos químicos. Após germinação, o basidiósporo dá origem a um micélio monocariótico, que contém apenas um núcleo por célula. No caso dos fungos heterotáticos, as hifas do micélio precisam de se fundir com outras hifas compatíveis

para estabelecerem o processo de reprodução sexuada (plasmogamia). Após este processo produz-se micélio dicariótico, que é caracterizado pela presença de dois núcleos haplóides por célula e por ansas de ligação ou de conjugação que são alterações fisiológicas que permitem que cada septo da hifa receba um núcleo diferente (Figura 1). Posteriormente, o micélio dicariótico (no caso de fungos simbióticos) associa-se simbioticamente com as raízes da planta e é estimulado por esta e pelo meio envolvente a produzir basidiocarpos (cogumelos), recomeçando de novo o ciclo de vida (Campos & Costa, 2010).



**Figura 1.** Ilustração da manutenção do estado dicariótico através de ansas de ligação. A; Hifa dicariótica com dois núcleos de diferentes tipos. B; Desenvolvimento de uma hifa secundária que cresce de forma inversa contendo um dos núcleos. C; após divisão sincronizada de ambos os núcleos, um dos núcleos continua a dirigir-se para a hifa principal. D; desenvolvimento de dois septos, um que separa a hifa principal da secundária e outro que divide a hifa principal em dois. E; a hifa secundária funde-se com a principal, e o núcleo migra para esta. Ambas as células são agora dicarióticas. F; ilustração provável da divisão nuclear sem recurso a uma ansa de ligação resultando numa hifa dicariótica como em A, mas em que cada célula septada é monocariótica (Carlile et al., 2001).

### 1.3. *Paxillus involutus*, *Pisolithus arhizus*

Neste trabalho foram utilizados dois fungos do filo Basidiomycota: *Pisolithus arhizus* e *Paxillus involutus*. O género *Pisolithus* compreende fungos capazes de formar micorrizas e desde a década de 70 que têm sido utilizados em programas de reflorestação (Chambers & Cairney, 1999). É dos géneros mais promissores como

inóculo para programas de reflorestação de pinheiros e eucaliptos devido ao seu fácil cultivo em laboratório (Junghans et al., 1998). *Pisolithus arhizus* é um fungo bem disseminado, crescendo em bosques, pomares e em solos áridos. Contudo a produção de basidiocarpos parece ser mais beneficiada em locais húmidos e em locais perto de estradas. Este género apresenta carpóforos globulosos, de cor amarela escura ou castanha. A deiscência (abertura espontânea por maturidade do cogumelo) é bastante irregular, e a gleba (conjunto de esporos) é castanha e composta por inúmeras cavidades (Webster & Weber, 2007). O rizomorfo (aglomerado de hifas imitando raízes) é difuso e bastante simples, facilitando a absorção de água e nutrientes. Este género possui também a capacidade de formar esclerócios, que são estruturas constituídas pela organização de partes do micélio com reservas alimentares que sobrevivem durante períodos desfavoráveis ao desenvolvimento do fungo, nomeadamente falta de água e de substrato.

O género *Paxillus* compreende fungos sapróbios e micorrízicos, sendo a espécie *Paxillus involutus* a mais utilizada em laboratório. Este é um fungo micorrízico facultativo (Chambers & Cairney, 1999) que tem revelado bastante potencial em biorremediação, nomeadamente na absorção de cádmio (Blaudez et al., 2000; Courbot et al., 2004) e salinidade (Luo et al., 2011). Este tem maior prevalência em regiões temperadas em detrimento de zonas tropicais (Chambers & Cairney, 1999). Morfologicamente, o cogumelo desta espécie possui um chapéu em forma de funil, a cor é geralmente acastanhada e com a margem enrolada. O basidiocarpo é suave e carnudo. O himénio (estrutura onde estão presentes os basídios) separa-se facilmente da carne do chapéu, as lâminas são decorrentes e de cor amarela enquanto que o pé é castanho, curto e carnudo. O odor e o sabor são bastante agradáveis, mas é uma espécie tóxica por acumulação (Webster & Weber, 2007). Esta espécie possui rizomorfos especializados em translocação de água e nutrientes com hifas que vão perdendo espessura à medida que se afastam do centro. Pode também ocorrer a formação de anastomoses que são conexões cruzadas entre hifas (Schweiger et al., 2002). Os esclerócios de *Paxillus involutus* são bastante escuros e de tamanhos variados, não ultrapassando os 3 mm de diâmetro e sendo cobertos por uma teia de micélio (Moore et al., 1991).

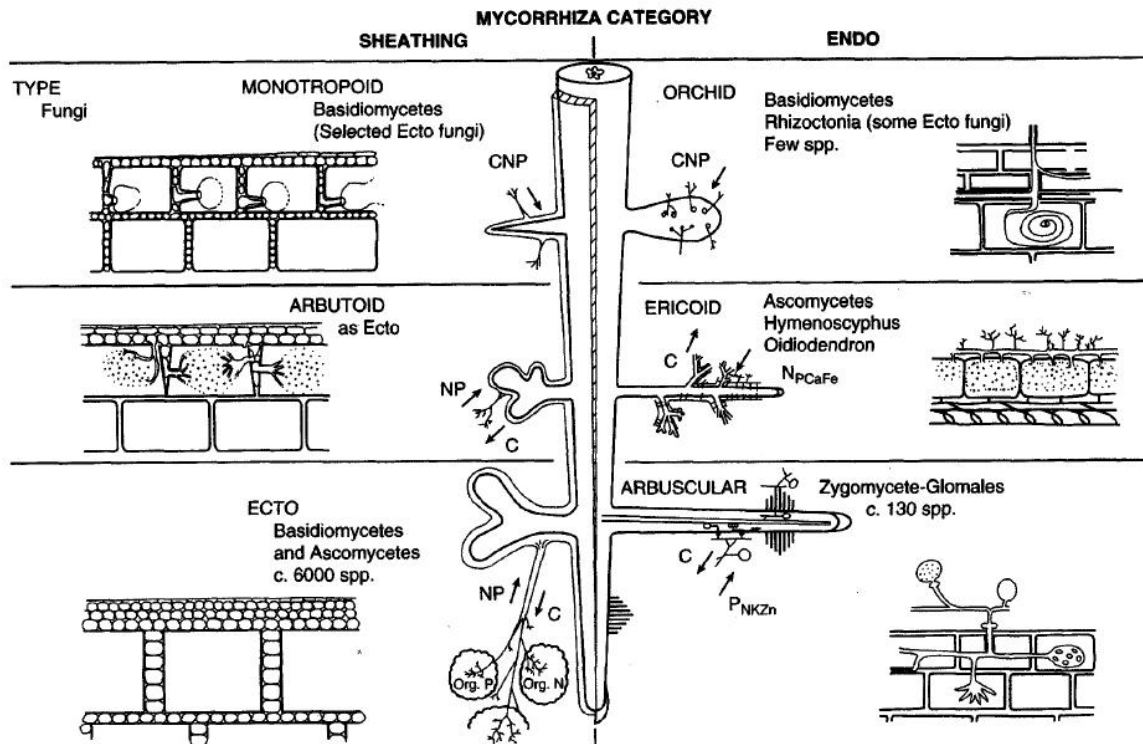
#### 1.4. *Pinus pinaster*

A espécie *Pinus pinaster*, também conhecida por Pinheiro Marítimo pertence à família das Pináceas. A sua distribuição ocorre essencialmente a Oeste do Mar Mediterrâneo (Portugal, Espanha, França...), na Europa do Sul e Norte de África. É utilizado sobretudo na protecção do solo, para lenha e resina, em carpintaria, na construção civil, na produção de papelão, na pasta de papel e sobretudo em programas de reflorestação devido ao seu bom crescimento em solos pobres e áridos (Alía & Martin., 2003; Gaspar et al., 2009). Outra particularidade desta espécie é a formação de oligómeros de procianidinas (flavonóides com forte poder antioxidante) e bioflavonóides na resina do tronco (Packer et al., 1999; Wood et al., 2002; Reis et al., 2012).

Em Portugal, de acordo com o Inventário Florestal Nacional, no ano de 2005 e 2006, a espécie *Pinus pinaster* representava 23% da área ocupada por floresta, traduzindo-se em 11% do total de exportações florestais em 2000. Devido a esta importância económica, desde os anos 80 que existe um plano nacional de melhoramento desta espécie (Gaspar et al., 2009). Apesar do *Pinus pinaster* ser considerado umas das espécies mais resistentes a pequenas e médias queimaduras, a sua resistência natural é suprimida por incêndios severos. Estes incidentes são os grandes responsáveis pela alteração da vegetação em Portugal. Assim, de modo a tentar contrariar essa alteração muitos estudos têm sido levados a cabo com fungos micorrízicos para verificar até que ponto eles podem ser benéficos na reflorestação de *Pinus pinaster* (Sousa et al., 2011). Fisiologicamente esta espécie pode ter entre 20 a 40 metros de altura, com copas largas e planas. A casca do tronco é bastante dura e grossa apresentando fissuras bastante profundas. A cor do tronco varia do vermelho ao castanho e as folhas, em forma de agulha, podem atingir os 25 cm de comprimento e têm uma cor verde bastante viva. As pinhas podem crescer até aos 22 cm, mas mantêm-se fechadas durante vários anos na árvore (CAB International, 2002; Alía & Martin., 2003).

## 1.5. Micorrizas e micorrização

O termo Micorriza provém do Grego e significa “fungo-raiz”. Foi inicialmente utilizado por Albert Frank em 1885, que tinha a convicção que estas associações beneficiavam tanto o fungo como a planta (Brundrett, 2004). Barker e Tagu (2000) definiram uma simbiose micorrízica como uma interação entre fungos e raízes de plantas existentes na natureza desde a germinação até à morte da planta. Como foi referido anteriormente, esta sinergia entre plantas e fungos é uma simbiose mutualista, pois ambas as espécies retiram proveito da associação. Enquanto o número de fungos que podem formar micorrizas é pequeno, estima-se que cerca de 80% das famílias vegetais forma pelo menos um tipo de micorriza (Smith & Read, 1997). Segundo Barker e Tagu (2000), existem 4 diferentes tipos de micorrizas no que diz respeito às classes de fungos que as constituem. As micorrizas ericóides em que participam fungos do filo Ascomycota e plantas da ordem das Ericáceas; as micorrizas de orquídeas em que participam fungos do filo Basidiomycota e plantas da família Orchidaceae (orquídeas); as micorrizas arbusculares, em que participam fungos do filo Zygomycota e a maioria das plantas terrestres, e finalmente as ectomicorrizas que se estabelecem entre árvores e fungos filamentosos. Existe outra classificação esquematizada por D.J. Read (2002) que propõe uma divisão em 6 categorias (Figura 2), tendo em conta os locais de micorrização. Assim, existem as Ectomicorrizas que formam rede de Hartig, manto e micélio extracelular; as micorrizas Monotropóides que formam protuberâncias fúngicas; as Arbutóides (Ectendomicorrizas) que desenvolvem também redes de Hartig e penetram as células da raiz e as Endomicorrizas (que englobam as micorrizas de orquídeas, as ericóides e as arbusculares) que não desenvolvem rede de Hartig mas que penetram as células da raiz. A rede de Hartig é uma estrutura formada pelo fungo dentro da raiz, entre as células, servindo de local de trocas metabólicas entre o fungo e a planta (Reis et al., 2011b), porém os passos da sua formação ainda não estão totalmente descritos (Heller et al., 2008).



**Figura 2.** Representação esquemática dos 6 tipos diferentes de micorrizas, bem como as principais vias de absorção de nutrientes, em que “C” representa o carbono, “N” o azoto, “P” o fósforo, “Org” as formas orgânicas, “Zn” o zinco, “Ca” o cálcio e “Fe” o ferro D.J. Read (2002).

As estratégias de formação de ectomicorrizas e endomicorrizas são inicialmente bastante similares e envolvem a germinação de um esporo, adsorção à superfície da raiz, penetração da mesma e finalmente a ramificação e entrada da hifa (Barker & Tagu, 2000). No caso das ectomicorrizas este processo envolve uma infinidade de mecanismos hormonais e genéticos, bem como trocas minerais e auxílio de bactérias. Slankis (1973) propôs a teoria da formação de micorrizas por acção de fitorreguladores, em que estipulava que apenas a libertação de auxinas por parte do fungo seria responsável pela morfologia das ectomicorrizas, e conseqüentemente, as condições ambientais que favorecessem a produção de auxinas potenciavam a formação deste mutualismo (Tranvan et al., 1998; Barker & Tagu, 2000). Até à data, e após muitos estudos, ainda não se pode ter a certeza de todos os fitorreguladores e sua conseqüente alteração de concentrações que intervêm na formação de ectomicorrizas (Sauter & Hager 1989; Tranvan et al., 1998). As auxinas são fitorreguladores que ao serem libertadas pelo fungo são responsáveis pelo enraizamento de várias espécies de pinheiro, pela formação de micorrizas e pela morfologia típica destas associações (Tranvan et al., 1998; Niemi et al., 2002), mas actualmente já se sabe que não são apenas as auxinas as responsáveis



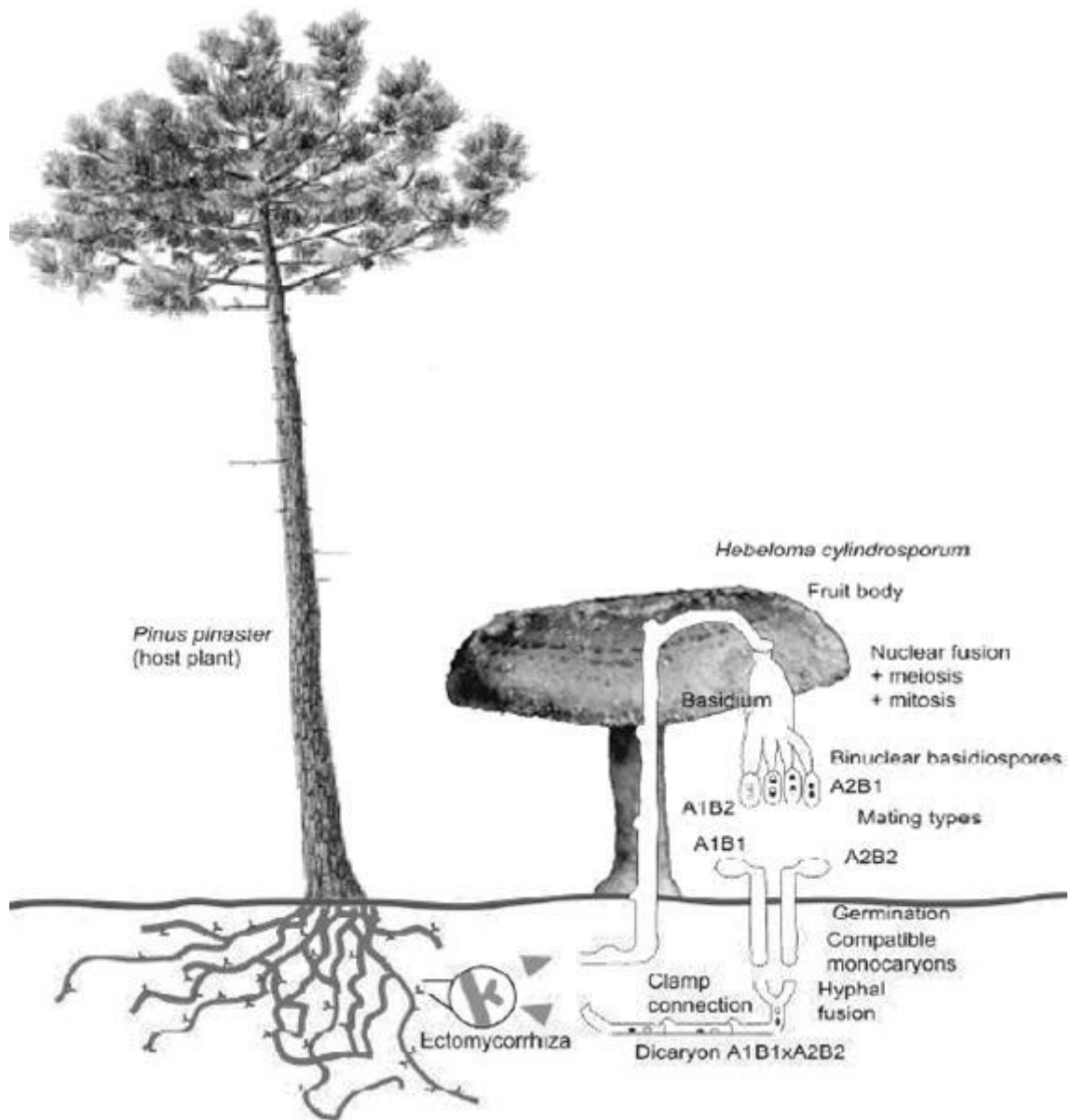
pela formação destas associações, tendo sido responsabilizados outros fitorreguladores como o etileno, as poliaminas e as citoquininas que em sinergia e de um modo concertado potenciam a formação de estruturas micorrízicas (Barker & Tagu, 2000; Sarjala et al., 2010; Niemi et al., 2002). À medida que a tecnologia foi evoluindo a influência dos genes começou a ganhar peso na explicação dos mecanismos de formação de micorrizas. Na fase pré-micorrízica o fungo expressa genes de crescimento antes de qualquer estrutura micorrízica se começar a formar (Sarjala et al., 2010), por outro lado há codificação de proteínas G que são responsáveis pelos fluxos de aniões e catiões causando despolarizações, alcalinizações extracelulares, fosforilações e desfosforilações de outras proteínas ainda desconhecidas e finalmente a libertação de espécies reactivas de oxigénio (ROS). Analogamente a este processo dá-se a transcrição de genes que codificam enzimas, tais como quinases e proteases, ou ainda a libertação de peroxidases para o espaço extracelular. Presume-se que a finalidade destas enzimas é alterar as paredes celulares tanto da raiz como do micélio, assim como libertar moléculas sinalizadoras secundárias. Quando as estruturas micorrízicas estão em formação, há também expressão de genes relacionados com a sinalização de stresse, defesa e resgate celular tal como acontece quando existe uma invasão por fungos patogénicos (Heller et al., 2008). Outros agentes que possivelmente auxiliam a produção de ectomicorrizas são as bactérias que habitam a ectomicorrizosfera como provou Poole (2001) quando conseguiu potenciar a formação de ectomicorrizas entre *L. rufus* e *P. sylvestris*.

Ecologicamente as micorrizas são bastante importantes na medida em que auxiliam as plantas a vários níveis. Em termos de absorção por parte das raízes pode-se destacar a absorção de azoto (Corrêa et al., 2006) e fósforo (Fitter, 1991). Foram também publicados estudos que indicam uma maior concentração de cobre, manganês, magnésio, cálcio, ferro e zinco em frutos de árvores inoculadas com micorrizas quando comparados a frutos de árvores sem inoculação (Silva et al., 2003). As micorrizas também melhoram a resistência ao stresse hídrico por aumento do fluxo de transpiração, aumento da área de absorção de água ao nível da raiz e pela diminuição da resistência à entrada desta para as células radiculares (Lamhamedi et al., 1992). As micorrizas aumentam também a tolerância à temperatura, variação de pH, resistência ao apodrecimento de raízes, ajudam na produção de reguladores de crescimento (Duñabeitia et al., 2004), auxiliam a planta na resistência a organismos patogénicos

(Maier et al., 1995; Schelkle & Peterson, 1996; Heller et al., 2008) e melhoram a agregação do solo (Rilling & Mummey, 2006). Quando a inoculação se faz em estádios iniciais do crescimento de plantas, as micorrizas podem auxiliar no seu crescimento e ampliam a taxa de sobrevivência (Heidjen, 2001). Tendo em conta que estas associações também beneficiam o fungo, este recebe compostos de carbono, essencialmente açúcares, e converte-os em álcoois derivados de açúcar, como é o caso do manitol (Carlile et al., 2001; Martins, 2004, 2008).

Existem poucas evidências da especificidade entre as plantas hospedeiras e os fungos micorrízicos, contudo é possível observar uma maior ou menor compatibilidade nas interações micorrízicas. Malajczuk et al. (1990) compararam a inoculação de *Pisolithus arhizus* em *Pinus* e *Eucalyptus* e chegaram à conclusão que havia um atraso da colonização das raízes de pinheiro de 3 dias em relação aos 2 dias necessários para a colonização das raízes do eucalipto. Isto pode ser revelador de uma micorrização diferencial por parte dos fungos e que são eles que se adaptam à planta e não o inverso.

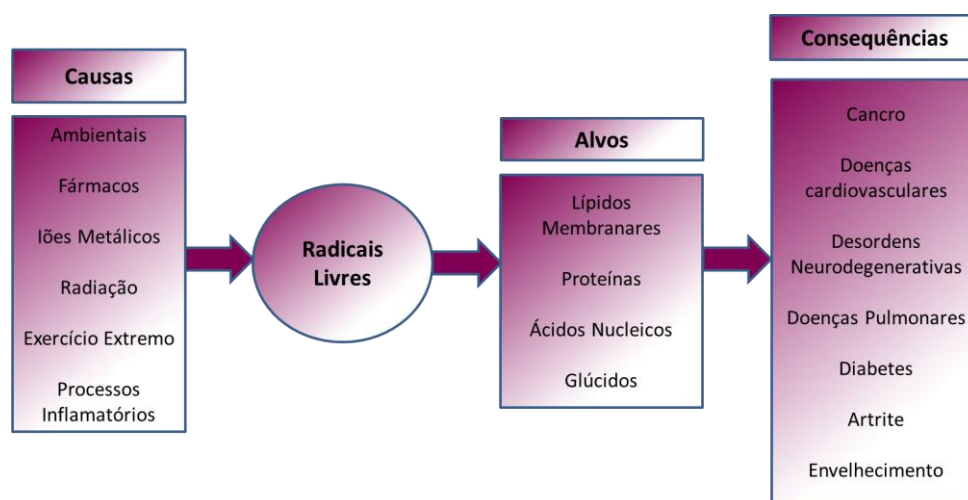
Tendo estes processos de micorrização em mente, o nosso trabalho envolveu a micorrização de *Pinus pinaster* com *Pisolithus arhizus* e *Paxillus involutus* de modo a avaliar a actividade antioxidante de compostos presentes nas raízes, micélios e meios de cultura tanto em simbiose como isolados. Todos os ensaios foram conduzidos *in vitro* de modo a eliminar as variações impostas pelos factores ambientais, variabilidade química e genética.



**Figura 3.** Esquema de uma interação micorrízica típica entre *Pinus pinaster* e o fungo *Hebeloma cylindrosporum*, evidenciando as estruturas e processos de micorrização típicos de fungos do filo Basidiomycota (Müller et al., 2007).

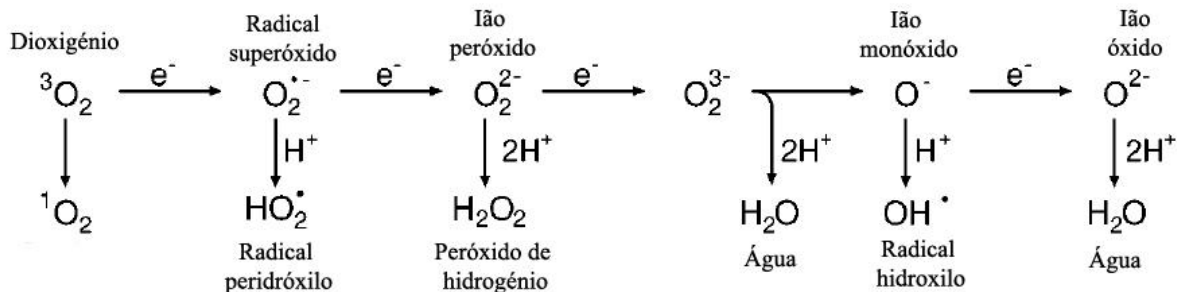
## 1.6. Stresse Oxidativo

Um radical livre é definido como qualquer átomo ou molécula que possui electrões desemparelhados na sua orbital exterior (Halliwell & Gutteridge, 1984). Os radicais livres de oxigénio, ou mais genericamente, espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS) são, em condições normais, produtos do metabolismo celular. Ambos são conhecidos tanto por terem funções prejudiciais como benéficas aos organismos vivos. Os efeitos benéficos ocorrem a concentrações baixas quando actuam nas respostas celulares a danos infecciosos e na indução de resposta mitogénica. Os efeitos prejudiciais traduzem-se nos stresses oxidativo e nitrosativo que ocorrem quando existe uma sobre produção de ROS e RNS, ou quando não existem antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos suficientes na célula (Valko et al., 2007). Este desequilíbrio (entre defesas antioxidantes e stresse oxidativo e/ou nitrosativo) pode oxidar as células, degradar os lípidos membranares, as proteínas e as cadeias de DNA levando a uma modificação e inibição do seu funcionamento normal. As ROS são a classe mais comum de radicais produzidos por organismos aeróbios (Miller et al., 1990). As doenças que podem advir do stresse oxidativo são imensas, destacando-se vários tipos de cancro, diabetes, cirroses, doenças cardiovasculares e neurológicas. Outra consequência importante é o próprio envelhecimento. O stresse oxidativo pode ser desencadeado por diversos factores (Figura 4), nomeadamente ambientais, fármacos, iões metálicos, radiação, excesso de exercício físico e processos de inflamação (Ferreira et al., 2009).



**Figura 4.** Diagrama das causas, alvos e consequências do stresse oxidativo levado a cabo por radicais livres (Ferreira et al., 2009).

O mecanismo de desencadeamento do stresse oxidativo tem origem na molécula de oxigénio ( $O_2$ ) como está patente na figura 5.



**Figura 5.** Mecanismo de reacção das espécies reactivas de oxigénio, com início no dioxigénio, e por captação de um electrão livre para preencher a orbital exterior forma-se sucessivamente o radical peridróxilo, o peróxido de hidrogénio, a água, o radical hidroxilo, até que esta oxidação acaba na formação de uma molécula de água (Apel & Hirt, 2004).

Tendo em consideração que os factores que impulsionam o stresse oxidativo não podem ser completamente controlados, torna-se importante aumentar o consumo de antioxidantes nos alimentos. Os vegetais e frutas são alimentos bastante ricos em antioxidantes, tal como as vitaminas A, C e E, carotenóides, polifenóis e flavonóides que previnem os danos provocados pelos radicais livres ao reduzir o risco de doenças crónicas.

Os cogumelos têm sido muito utilizados na alimentação e como medicamentos na Ásia. Estes fungos são ricos em compostos fenólicos que são excelentes antioxidantes devido à sua capacidade de captação de radicais livres por transferência de um electrão ou de um átomo de hidrogénio. Inúmeros cogumelos comestíveis, nomeadamente do Nordeste de Portugal, provaram ter actividade antioxidante, facto este que se correlaciona bastante bem com a quantidade de fenóis encontrada nestes alimentos (Barros et al., 2007b; Heleno et al., 2010; Grangeia et al., 2011; Pereira et al., 2012).

Para além de explorar fungos como fonte de antioxidantes que possam ser utilizados no combate às consequências do stresse oxidativo, este trabalho tem outra perspectiva de interesse, nomeadamente a compreensão da produção de ROS e RNS como resposta à micorrização nos primeiros estádios de contacto, e consequente diminuição ao longo do tempo, após o reconhecimento de uma simbiose mutualista.

Reis et al. (2011b) referiram que, como resposta a uma associação simbiótica entre germinantes de *Pinus pinaster* e fungos micorrízicos, os mecanismos de stresse oxidativo são provavelmente activados e amplificados até ao ponto em que haja um reconhecimento por parte da planta do benefício que o fungo trará. Porém, após este reconhecimento, a simbiose entre o fungo e a germinante pode ter efeitos bastante importantes na produção de antioxidantes por parte de ambos. Existem cada vez mais provas que compostos resultantes do metabolismo secundário têm um papel importante na interacção entre a planta e o ambiente que a rodeia (Reis et al., 2012).

### 1.7. Enquadramento do trabalho

Este trabalho resulta de uma contínua pesquisa dos mecanismos de estabelecimento da simbiose mutualista entre dois fungos (*Pisolithus arhizus* e *Paxillus involutus*) e germinantes de *Pinus pinaster*, bem como da determinação de compostos antioxidantes produzidos nos primeiros estádios dessa micorrização.

Anteriormente, foi levado a cabo um estudo que utilizou as mesmas matrizes biológicas para determinar as diferenças a nível antioxidante nos primeiros estádios de contacto (48h) e após 45 dias de simbiose (Reis et al., 2011b, 2012). Nesse trabalho, concluiu-se que o fungo *Paxillus involutus* cresceu melhor quando isolado e que a espécie *Pisolithus arhizus* apresentou um melhor crescimento quando em associação com *Pinus pinaster*. A nível de concentração em tocoferóis, o fungo que apresentou melhores resultados foi *Pisolithus arhizus*. Contudo, em relação ao perfil fenólico, *Paxillus involutus* foi o fungo que apresentou maior quantidade de ácido *p*-hidroxibenzóico, e a presença da raiz provocou um aumento na concentração de fenóis totais, enquanto em *Pisolithus arhizus*, a presença da raiz pareceu não alterar a produção de fenóis, tendo havido uma redução das propriedades antioxidantes. Reis et al. (2011b), concluíram ainda que estas diferenças poderiam estar relacionadas com uma maior compatibilidade deste fungo em relação ao hospedeiro, mas que seria necessário testar outros tempos de contacto de forma a corroborar esta conclusão.

## 1.8. Objectivos

Este trabalho teve como principal objectivo o estudo dos efeitos da micorrização entre *Pinus pinaster* e duas espécies de fungos ectomicorrízicos, *Pisolithus arhizus* e *Paxillus involutus*, nas propriedades antioxidantes das espécies associadas e na produção de compostos bioactivos pelas mesmas.

Para tal, foram estudados diferentes tempos de contacto entre as espécies – 6h, 24h e 72h, de forma a:

- Avaliar o efeito das espécies na actividade antioxidante do respectivo simbionte, nomeadamente na actividade captadora de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH), poder redutor, inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno e inibição da peroxidação lipídica pela diminuição da formação de espécies reactivas do ácido tiobarbitúrico (TBARS).
- Monitorizar a concentração de compostos antioxidantes, nomeadamente fenóis, tocoferóis e açúcares.

Todos os parâmetros foram determinados em cada um dos parceiros de simbiose (raiz e micélio) e também no meio de cultura, de forma a avaliar a resposta de cada elemento à associação simbiótica.

As propriedades antioxidantes foram avaliadas através de quatro diferentes metodologias: determinação de fenóis totais pelo ensaio de *Folin Ciocalteus*, actividade captadora de radicais DPPH (analisada pelo decréscimo da absorvância a 515 nm da solução de DPPH), poder redutor (avaliado pela medição da redução do  $\text{Fe}^{3+}$  à sua forma ferrosa -  $\text{Fe}^{2+}$ ), a inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno (pelo sistema  $\beta$ -caroteno/linoleato, através da neutralização do radical livre linoleato que ataca as ligações insaturadas de  $\beta$ -caroteno) e inibição da peroxidação lipídica pelas espécies reactivas do ácido tiobarbitúrico (monitorizando a formação do cromogéneo MDA-TBA a 532 nm).

O conteúdo em tocoferóis foi determinado por HPLC acoplado a um detector de fluorescência. O perfil em açúcares foi também avaliado por HPLC acoplado a um detector de índice de refração (RI).

Os efeitos observados podem ser interpretados do ponto de vista ecológico (compreensão dos efeitos da associação micorrízica na produção de antioxidantes, nomeadamente a percepção se este mutualismo potencia a actividade antioxidante ou se, por outro lado, a inibe), mas também do ponto de vista medicinal (utilização das associações simbióticas para obtenção de antioxidantes).



## II. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material biológico

O material biológico do presente trabalho inclui plantas e fungos micorrízicos: germinantes de pinheiro bravo, *Pinus pinaster* e 2 espécies de fungos simbióticos, *Pisolithus arhizus* e *Paxillus involutus*.

As duas espécies de fungos micorrízicos, *Pisolithus arhizus* e *Paxillus involutus* (Tabela 1), foram colhidas em sotos (povoamentos de *Castanea sativa* Mill) na região de Bragança no Outono de 2008. O esporocarpo de cada espécie foi identificado segundo Benguria (1985).

As sementes de *Pinus pinaster* (Tabela 1) foram adquiridas no CENASEF (Centro Nacional das Sementes Florestais).

**Tabela 1.** Classificação das espécies em estudo.

Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Género	Espécie
Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Boletales	Paxillaceae	<i>Paxillus</i>	<i>Paxillus involutus</i> (Batsch ex Fr.) Fr.
Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Sclerodermatineae	Sclerodermataceae	<i>Pisolithus</i>	<i>Pisolithus arhizus</i> (Scop.) Rauschert
Plantae	Pinophyta	Pinopsida	Pinales	Pinaceae	<i>Pinus</i>	<i>Pinus pinaster</i> (Aiton)

### 2.2. Germinação das sementes de *Pinus pinaster*

As sementes de *Pinus pinaster* foram submetidas a um tratamento de desinfecção (Harvengt, 2005) sendo colocadas sob agitação em hipoclorito de sódio 5% com duas gotas de Tween® 80 durante 15 min. Após lavagem com água estéril na câmara de fluxo laminar foram depositadas em etanol a 80% durante 15 min e

finalmente lavadas de novo com água estéril. Posteriormente, as sementes foram transferidas para tubos de ensaio com 30 mm de diâmetro contendo como meio de cultura agar-água a 0,8%. De modo a induzir a germinação, os tubos de ensaio foram colocados no escuro durante 48h a 25 °C e posteriormente colocados à luz numa câmara de cultura com lâmpadas Daylight (Phillips, Amsterdão, Holanda), Gro-Lux (Sylvania) com um fotoperíodo de 16h de luz e 8h de escuro.

### 2.3. Produção de micélio *in vitro*

O micélio de ambas as espécies em estudo foi obtido a partir das culturas do Laboratório de Biologia e Biotecnologia da Escola Superior Agrária de Bragança, que mantém os micélios em cultura desde o seu isolamento, aquando da colheita e identificação dos fungos. Foi posteriormente repicado para placas de Petri de vidro (9 cm de diâmetro) contendo meio de cultura de Melin-Norkrans (MMN); pH 6,6 (Tabela 2). As novas placas foram mantidas durante 4 semanas na câmara de cultura referida anteriormente, na ausência de luz.

**Tabela 2.** Composição do meio de cultura Melin-Norkrans; pH 6,6.

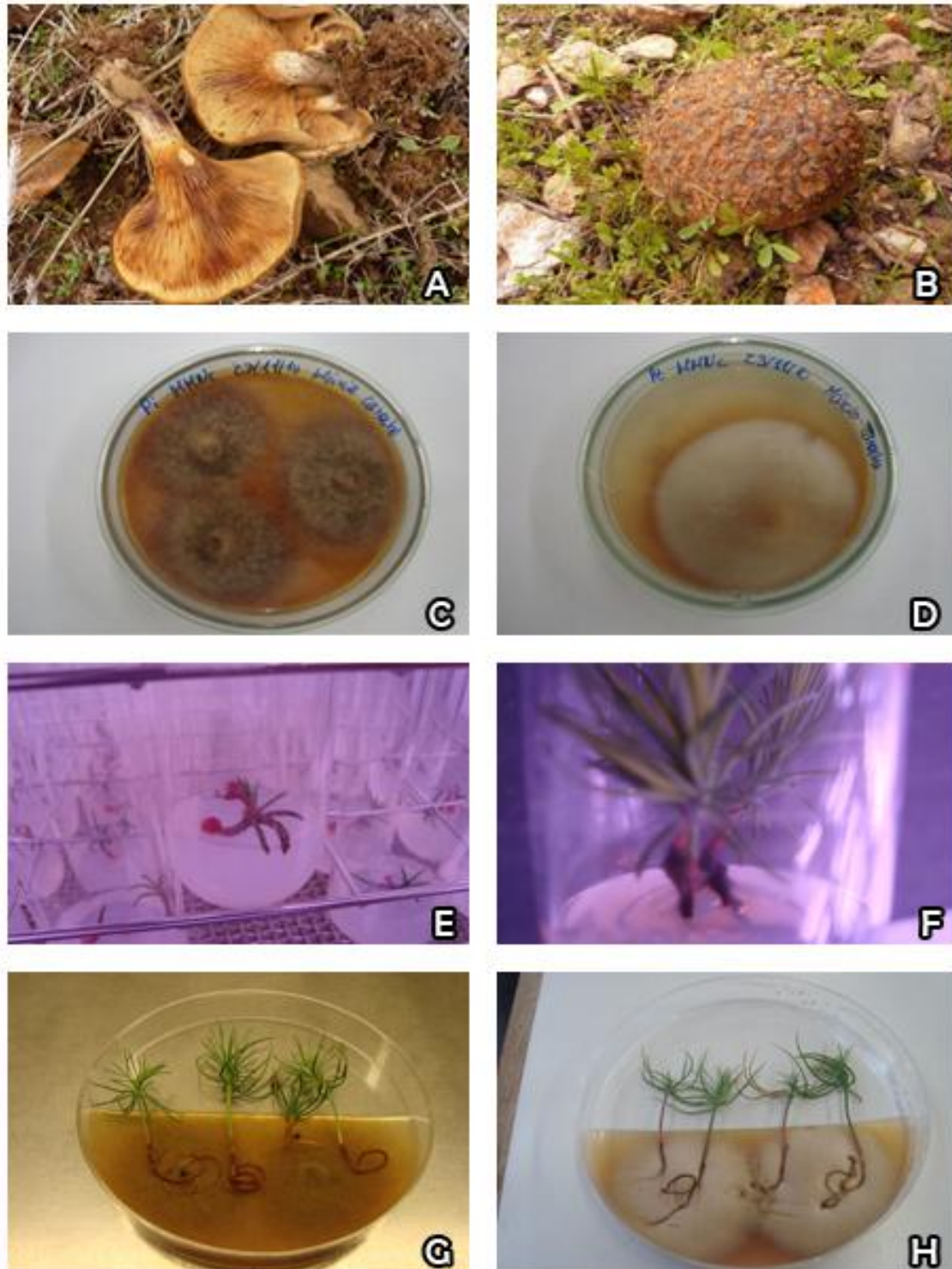
Reagente	Concentração (g/l)
NaCl	0,025
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,250
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,500
FeCl <sub>3</sub>	0,005
CaCl <sub>2</sub>	0,050
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,150
Tiamina	1,00 × 10 <sup>-4</sup>
Glucose	10,0
Casaminoácidos	1,00
Malte	5,00
Agar	20,0

### 2.4. Indução da micorrização *in vitro*

Após o crescimento dos micélios (obtenção do material necessário), estes foram repicados para placas de Petri (12 cm de diâmetro) com meio de cultura de Melin-

Norkans incompleto (sem malte e sem casaminoácidos) em “slant”, e deixados a crescer durante 20 dias no escuro. Concluído o período de tempo de crescimento dos micélios e germinação das plantas, foram transferidos 3 germinantes de *Pinus pinaster* para cada placa de Petri, colocados sobre o micélio, e deixados a crescer em co-cultura na câmara de cultura, nas condições já referidas. A parte inferior das placas de Petri, na qual se encontravam as raízes das plantas em contacto com o fungo, foi protegida da luz com papel de alumínio, de forma a mimetizar as condições naturais do desenvolvimento de micorrizas.

Efectuou-se o estudo da produção de compostos e actividade antioxidante do fungo e da planta ao longo do período de co-cultura, para os seguintes tempos de contacto raiz-fungo: 0, 6, 24 e 72h. Estes ensaios foram realizados para ambas as espécies de fungos micorrízicos. Foram também preparados ensaios controlo em que nenhum dos simbiontes esteve em contacto.



**Figura 6.** Estampa do material biológico. A. Corpo de frutificação de *Paxillus involutus*. B. Corpo de frutificação de *Pisolithus arhizus*; C. Micélio de *Paxillus involutus*; D. Micélio de *Pisolithus arhizus*; E. Germinante de *Pinus pinaster*; F. Germinantes de *Pinus pinaster* após 3 semanas; G. *Paxillus involutus* + *Pinus pinaster* no momento de inoculação; H. *Pisolithus arhizus* + *Pinus pinaster* no momento da inoculação.

## 2.5. Preparação das amostras

Após os diferentes tempos de contacto raiz-fungo, as plantas foram separadas dos micélios e todo o material foi recolhido para análise. Assim, raízes, fungos e meio de cultura onde estes se desenvolveram foram colocados em gobelés e pesados separadamente para obtenção da massa fresca (fw). Posteriormente, as amostras foram congeladas e liofilizadas (liofilizador FreeZone 4.5 model 7750031, Labconco, Kansas, EUA) obtendo-se a massa seca (dw) correspondente. Finalmente, foram reduzidas a pó.

## 2.6. Padrões e Reagentes

Os solventes *n*-hexano 95%, acetonitrilo 99% e acetato de etilo 99,98%, grau HPLC, foram adquiridos à Fisher Scientific (Loures, Portugal). O solvente metanol, grau analítico, foi adquirido na Pronalab (Lisboa, Portugal). Os padrões utilizados na determinação de tocoferóis ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocoferol) e nos ensaios de actividade antioxidante, trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) e ácido gálico, foram adquiridos na Sigma (St. Louis, Missouri, EUA). O tocol racémico, 50 mg/ml foi fornecido pela Matreya (Pleasant Gap, Pensilvânia, EUA). O 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) foi obtido na Alfa Aesar (Ward Hill, Massachusetts, EUA). Os açúcares padrão (D-frutose 98%, D-glucose, D-sacarose 99,0%, D-manitol 98% e D-trealose di-hidratada 99,5%) foram fornecidos pela Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, EUA). Os restantes reagentes químicos utilizados foram adquiridos na Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, EUA). A água utilizada foi tratada num sistema de purificação Milli-Q (TGI Pure Water System, Greenville, Carolina do Sul, EUA).

## 2.7. Determinação da actividade antioxidante

### 2.7.1. Preparação dos extractos metanólicos

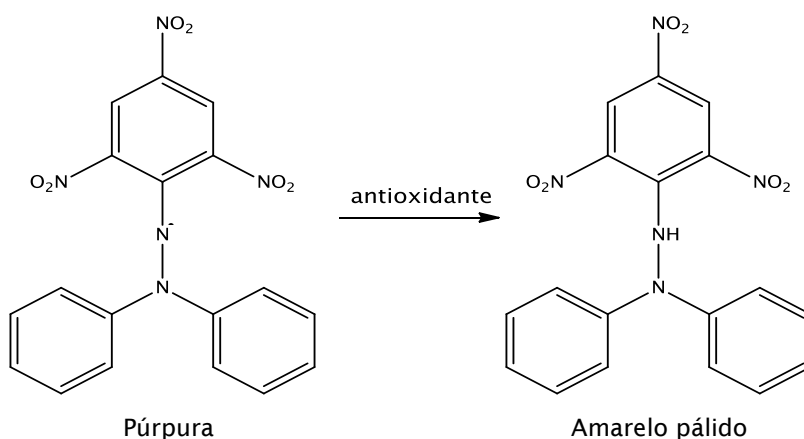
As amostras (0,4 g para os fungos; 0,4 g para as raízes da planta e 4 g para os meios de cultura) foram submetidas a uma extracção sólido-líquido com 30 ml de metanol em placa de agitação (a 25 °C a 150 rpm), durante 1h e posteriormente filtradas através de papel Whatman nº 4. O resíduo sólido obtido foi re-extraído sob as mesmas

condições. Os extractos líquidos combinados foram evaporados num evaporador rotativo (Büchi R-210, Flawil, Suíça) a 40°C e o extracto obtido foi re-dissolvido em metanol, de forma a obter soluções com concentração de 10 mg/ml, para fungos e raízes, e 100 mg/ml para os meios de cultura. A partir destas soluções iniciais foram preparadas várias soluções com concentrações diferentes, a partir do método das diluições sucessivas. Estas soluções metanólicas foram utilizadas na realização dos diferentes ensaios de avaliação da actividade antioxidante e mantidas a uma temperatura de 4 °C entre os mesmos.

### 2.7.2. Ensaio da actividade captadora de radicais DPPH

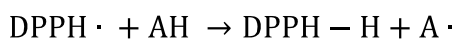
#### 2.7.2.1. Fundamento teórico

O DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) é um radical de azoto, sintético e bastante estável devido à deslocalização do electrão livre. Esta deslocalização também origina a cor púrpura intensa característica desta molécula. Reage facilmente com compostos que têm capacidade de doar um átomo de hidrogénio reduzindo-o e levando à formação de um composto (hidrazina) amarelo-pálido (Antolovich et al. 2002; Amarowicz et al., 2004).



**Figura 7.** Esquema de redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo).

A reacção do DPPH com um antioxidante pode ainda ser descrita pela seguinte equação:



Em que AH representa um composto antioxidante e A<sup>•</sup> representa o radical formado (Brand-Williams, 1995). Recentemente tem-se utilizado o valor de EC<sub>50</sub> como parâmetro de análise de resultados deste método, definido como a concentração de extracto necessária para provocar a perda de 50% da actividade do radical DPPH (Molyneux, 2004).

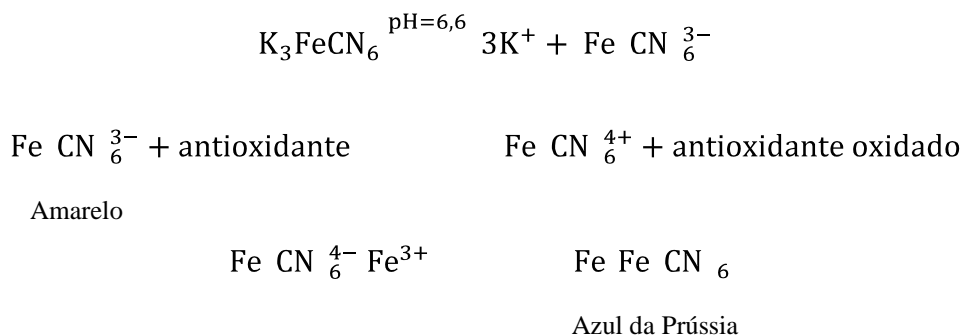
#### 2.7.2.2. Metodologia

A actividade captadora de radicais DPPH foi monitorizada utilizando um leitor de microplacas ELX800 (Bio-Tek Instruments, Inc, Winooski, Vermont, EUA). As soluções metanólicas, previamente preparadas (30 µl), foram colocadas nos diferentes poços das microplacas (96 poços) e posteriormente foram adicionados 270 µl de uma solução de DPPH ( $6 \times 10^{-5}$  mol/l). A mistura foi colocada no escuro durante cerca de 30 min e a absorvância foi medida a um comprimento de onda de 515 nm. A actividade captadora do radical (ACR) foi calculada como percentagem de descoloração da solução DPPH utilizando a fórmula  $\% \text{ ACR} = [(Abs_{\text{DPPH}} - Abs_s) / Abs_{\text{DPPH}}] \times 100$  onde  $Abs_{\text{DPPH}}$  corresponde à absorvância da solução de DPPH e  $Abs_s$  à absorvância da solução de DPPH na presença do extracto. O valor de EC<sub>50</sub> (concentração efectiva de extracto responsável pela captação de 50% de radicais DPPH) foi calculado por interpolação gráfica da percentagem de ACR em função da concentração do extracto. Como padrão para comparação foi utilizado o trolox.

#### 2.7.3. Poder redutor

##### 2.7.3.1. Fundamento teórico

Este ensaio permite medir a capacidade de um dado antioxidante reduzir o complexo Fe(III)/ferricianeto [ $\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ] a Fe(II), a sua forma ferrosa (Berker et al., 2007). Deste modo, a coloração amarela da solução é alterada para azul da Prússia, dependendo da concentração do antioxidante presente na solução. A reacção de redução processa-se de acordo com as seguintes equações:



**Figura 8.** Reacções envolvidas no ensaio de determinação do poder redutor das amostras.

### 2.7.3.2. Metodologia

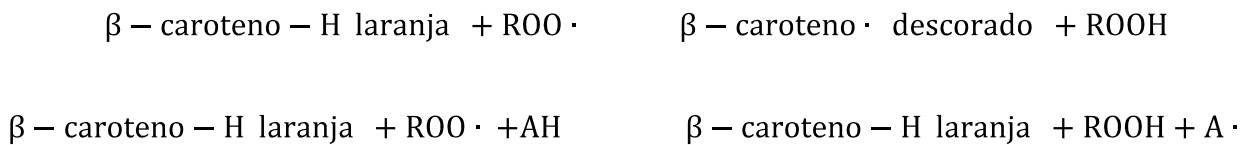
Neste ensaio, começou-se por adicionar a 500 µl das soluções metanólicas dos extractos, 500 µl de ferricianeto de potássio (1% m/v) e tampão fosfato de sódio (0,2 mol/l, pH 6,6). Após incubar as soluções a 50 °C durante 20 min, foram adicionados 500 µl de ácido tricloroacético a 10%. As misturas (800 µl) foram depois colocadas em microplacas de 48 poços contendo 800 µl de água desionizada. Finalmente, foram adicionados 160 µL de cloreto férrico a 0,1% a cada um dos poços e os valores de absorvância foram lidos a 690 nm no leitor de microplacas descrito anteriormente. A concentração de extracto correspondente a uma absorvância de 0,5 (EC<sub>50</sub>) foi calculada por interpolação gráfica da absorvância em função da concentração do extracto. O padrão utilizado neste ensaio foi também o trolox.

## 2.7.4. Inibição da descoloração do β-caroteno

### 2.7.4.1. Fundamento teórico

A actividade antioxidante dos extractos foi avaliada pelo sistema β-caroteno linoleato (Mi-Yae et al., 2003). Este ensaio baseia-se em medições espectrofotométricas da descoloração do β-caroteno, avaliando a capacidade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico. O ensaio ocorre segundo as seguintes equações:





**Figura 9.** Reações envolvidas no ensaio de determinação do  $\beta$ -caroteno.

Este mecanismo está envolvido na descoloração dos carotenóides através de uma oxidação térmica, que pode ser diminuída pela acção dos antioxidantes existentes na amostra (Amarowicz et al., 2004; Kaur & Geetha., 2006). Assim, a diminuição da coloração alaranjada do  $\beta$ -caroteno é inversamente proporcional à quantidade de antioxidantes presentes nos extractos.

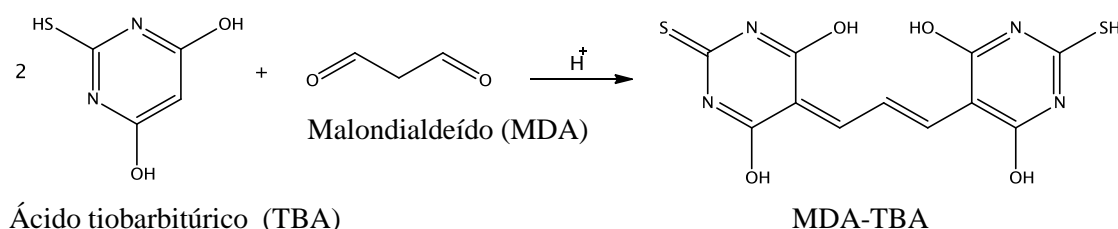
#### 2.7.4.2. Metodologia

Para avaliar a capacidade antioxidante de uma amostra por esta técnica, preparou-se uma solução de  $\beta$ -caroteno (2 mg) em 10 ml de clorofórmio; posteriormente pipetaram-se 2 ml desta solução para um balão periforme de 100 ml. O clorofórmio foi removido a 40 °C sob vácuo. A esta solução foram adicionadas  $\approx$ 40 mg de ácido linoleico, 400 mg de emulsificador Tween®80 e 100 ml de água desionizada. Após agitar vigorosamente esta solução, de forma a obter uma emulsão perfeita, foram transferidas alíquotas de 4,8 ml para tubos de ensaio contendo as soluções metanólicas dos extractos (200  $\mu$ l). Imediatamente após esta adição, a absorvância da mistura foi determinada a 470 nm (Espectrofotómetro Analytikjena 200, Jena, Alemanha), de modo a obter a medição do tempo inicial ( $T_0$ ). De seguida, os tubos de ensaio foram colocados sob agitação num banho a 50 °C durante 2h, após as quais foram novamente medidos os valores de absorvância ao mesmo comprimento de onda. A inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno foi calculada utilizando a seguinte equação:  $[(\text{Abs}_{470} \text{ após } 2\text{h}/\text{Abs}_{470} \text{ inicial}) \times 100]$ . A concentração de extracto correspondente a 50% da actividade antioxidante ( $\text{EC}_{50}$ ) foi calculada por interpolação gráfica da percentagem de inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno em função da concentração de extracto. O padrão utilizado foi o trolox.

## 2.7.5. Inibição da peroxidação lipídica através do ensaio das espécies reactivas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

### 2.7.5.1. Fundamento teórico

O ácido tiobarbitúrico (TBA) e o malondialdeído (MDA) costumam ser utilizados como biomarcadores da peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica pode ser determinada pela medição dos produtos de oxidação que reagem com o TBA para formar compostos de cor rosa, genericamente designados como substâncias reactivas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Figura 9), que são medidas por espectrofotometria a 532 nm (Ng et al., 2000; Kaur & Geetha., 2006).



**Figura 10.** Reacção envolvida no ensaio TBARS.

O TBA em associação com o MDA, na presença de iões  $\text{H}^+$ , forma um cromogéneo (MDA-TBA). Existem dois passos essenciais nesta reacção, em primeiro lugar, a solução contendo o antioxidante é oxidada devido à adição de um ião metálico, tal como o ferro ou o cobre; posteriormente, a extensão desta oxidação é ditada pelo ácido tiobarbitúrico, sendo que uma solução contendo um antioxidante irá travar a oxidação (Antolovich et al., 2002).

### 2.7.5.2. Metodologia

No ensaio laboratorial, foram utilizados homogeneizados cerebrais de porco em tampão tris-HCl (20mM; pH 7,4) posteriormente centrifugados a 3500g durante 10 min numa centrífuga refrigerada (Centurion K24OR, Centurion Scientific, West Sussex, Reino Unido). O homogeneizado resultante (100  $\mu\text{l}$ ) foi pipetado para tubos de ensaio contendo 200  $\mu\text{l}$  dos extractos metanólicos, 100  $\mu\text{l}$  de ácido ascórbico 100  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{l}$

de sulfato de ferro 10  $\mu$ M. A mistura foi depois incubada durante 1h a 37,5 °C num banho termostaticado. Ao fim deste tempo, a reacção foi parada pela adição de 500  $\mu$ l de ácido tricloroacético a 28% (m/v). Posteriormente, foram adicionados 380  $\mu$ l de ácido tiobarbitúrico a 2%. Finalmente, as soluções foram incubadas durante 20 minutos a 80 °C, centrifugadas a 3000g durante 5 min e medida a absorvância do sobrenadante no espectrofotómetro já mencionado a um comprimento de onda de 532 nm.

## 2.8.Determinação de compostos antioxidantes

### 2.8.1. Fenóis totais

#### 2.8.1.1. Fundamento teórico

O método colorimétrico *Folin-Ciocalteus* é um dos métodos de avaliação da quantidade de fenóis totais presentes numa amostra. Este é um teste amplamente usado em investigação, porém não isento de interferências e, na realidade, não é específico para fenóis (Kellie & Hayball, 2002) sendo também considerado um ensaio indicador do poder redutor e, portanto, da actividade antioxidante. Isto deve-se ao facto do reagente conter uma mistura de ácido fosfotúngstico e ácido fosfomolibdico que reage tanto com compostos fenólicos como com compostos não fenólicos (aminoácidos e açúcares), levando muitas vezes a falsos positivos e a uma sobre avaliação de compostos fenólicos. Os fenóis determinados por este método são expressos em equivalentes de ácido gálico (Oliveira et al., 2008). Quimicamente, ambos os ácidos que constituem o reagente de *Folin-Ciocalteus* são oxidados em meio alcalino, formando  $O_2$ , que posteriormente reage com o molibdato dando origem a óxido de molibdénio ( $MoO^{4+}$ ), composto este que possui uma absorvância bastante elevada ao comprimento de onda de 750 nm (Roginsky & Lissi, 2005).

#### 2.8.1.2. Metodologia

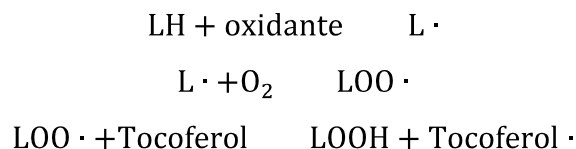
Neste ensaio, pipetaram-se 500  $\mu$ l de uma das soluções metanólicas para um tubo de ensaio adicionando-se, de seguida, 2500  $\mu$ l do reagente de *Folin-Ciocalteus*, previamente diluído em água numa proporção 1:9 v/v, e 2000  $\mu$ l da solução de

carbonato de cálcio (75 g/l). Após homogeneização no vórtex, os tubos de ensaio foram colocados num banho seco a 40 °C durante 30 min. Finalmente mediu-se a absorvância a 765 nm no espectrofotómetro referido anteriormente. Utilizou-se ácido gálico na determinação da curva-padrão, e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de extracto.

## 2.8.2. Determinação de tocoferóis

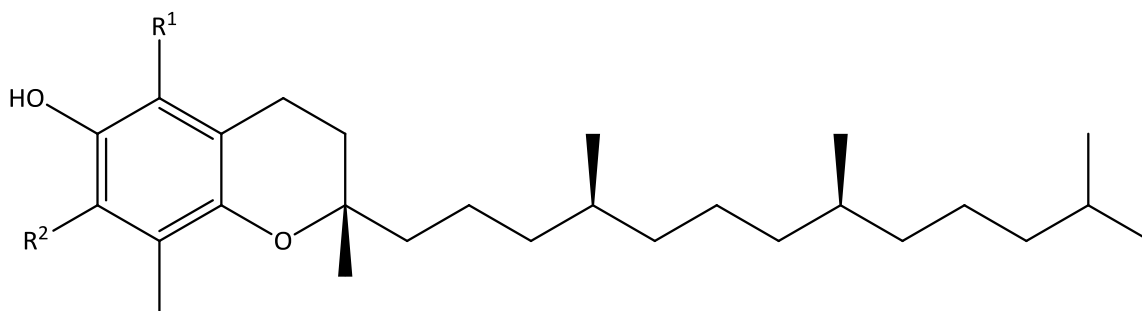
### 2.8.2.1. Tocoferóis como antioxidantes

A vitamina E engloba um grupo de tocoferóis relacionados ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ -tocoferol) que são os antioxidantes lipossolúveis que melhor protegem os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) das membranas contra a peroxidação lipídica (Mascio et al., 1991). Esta vitamina inibe a produção de radicais lipídicos peróxido induzidos por espécies reactivas de oxigénio, protegendo assim os PUFA das membranas fosfolipídicas. Protege também lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e o DNA. A actividade antioxidante dos tocoferóis processa-se pela doação de um átomo de hidrogénio aos radicais livres. Em organismos vivos, o poder antioxidante dos tocoferóis é o seguinte:  $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ , enquanto que *in vitro* esta ordem é revertida. O mecanismo de acção dos tocoferóis é o seguinte:



**Figura 11.** Reacções envolvidas na actividade antioxidante dos tocoferóis.

As membranas lipídicas (LH) ao serem atacadas por um composto oxidante formam um radical lipídico que posteriormente reage com o oxigénio dando origem ao radical peróxido (LOO $\cdot$ ). Este radical pode ser transformado num hidroperóxido lipídico (LOOH) por intermédio de um tocoferol (Figura 11) que lhe doa um átomo de hidrogénio, ficando ele próprio transformado num radical (Ferreira et al., 2009).



**Figura 12.** Estrutura química genérica dos tocoferóis ( $R^1=R^2=CH_3$ ,  $\alpha$ -tocoferol;  $R^1=CH_3$ ,  $R^2=H$ ,  $\beta$ -tocoferol;  $R^1=H$ ,  $R^2=CH_3$ ,  $\gamma$ -tocoferol;  $R^1=R^2=H$ ,  $\delta$ -tocoferol).

#### 2.8.2.2. Metodologia

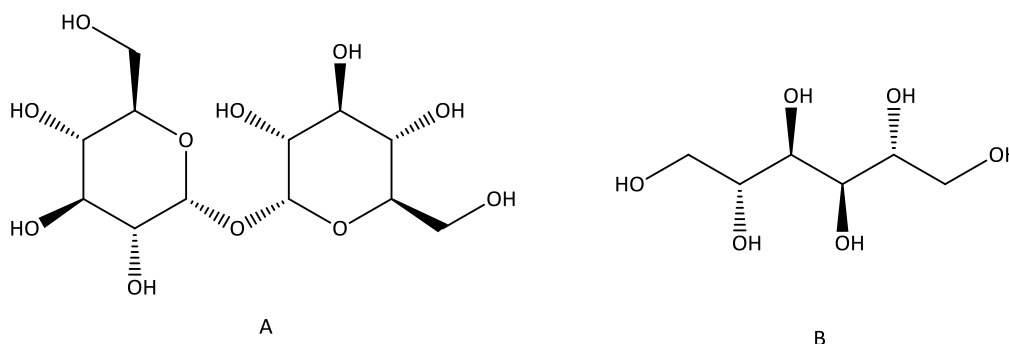
No ensaio laboratorial para detecção de tocoferóis utilizou-se o protocolo otimizado e implementado no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada (Barros et al., 2008a). Uma solução de BHT (2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol) em *n*-hexano (10 mg/ml; 100  $\mu$ l) e de padrão interno (PI) também em *n*-hexano (tocol; 2,0  $\mu$ g/ml; 250  $\mu$ l) foram adicionados às amostras a analisar antes da extração. As amostras ( $\approx$ 250 mg) foram homogeneizadas com 4 ml de metanol num vórtex durante 1 min. De seguida, adicionaram-se 4 ml de *n*-hexano e voltou-se a homogeneizar no vórtex (1 min). Foram adicionados 2 ml de uma solução aquosa concentrada de NaCl e levou-se mais 1 min ao vórtex. Centrifugou-se a mistura durante 5 min a 4000g e recolheu-se o sobrenadante. As amostras foram re-extraídas duas vezes com *n*-hexano. Os extractos combinados foram secos numa corrente de azoto, re-dissolvidos em 1 ml de *n*-hexano e desidratados com sulfato de sódio anidro. Após filtração por um filtro de 0,22  $\mu$ m, os extractos foram injectados e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O sistema de HPLC utilizado consistiu num sistema integrado com uma bomba Smartline 1000 (Knauer, Berlim, Alemanha), um desgaseificador (Smartline 5000), um amostrador automático AS-2057 e um detector UV a 295 nm (Knauer) ligado em série a um detector de fluorescência FP-2020 (Jasco, Easton, Maryland, EUA) programado para comprimentos de onda de excitação de 290 nm e emissão de 330 nm. Os resultados obtidos foram analisados recorrendo ao “software” Clarity 2.4 (DataApex). A separação cromatográfica foi feita numa coluna de poliamida II (250  $\times$  4,6 mm) de fase normal (YMC Water, Dinslaken, Alemanha) a operar a 30  $^{\circ}$ C (forno 7971 R Grace). A fase móvel utilizada constituiu uma mistura de *n*-hexano e acetato de etilo (70:30, v/v) com

fluxo de 1 ml/min e o volume de injeção foi de 20  $\mu$ l. Os compostos foram identificados através de comparação cromatográfica com padrões comerciais. A quantificação foi baseada na resposta do sinal fluorescente, utilizando o método do padrão interno. A quantidade de tocoferóis presente nas amostras foi expressa em mg por g de massa seca (dw).

### 2.8.3. Determinação de açúcares livres

#### 2.8.3.1. Açúcares como antioxidantes

Os açúcares são apenas uma pequena parte do conteúdo total de glúcidos uma vez que os cogumelos silvestres são ricos em polissacáridos tais como glicogénio (polissacárido de reserva nos cogumelos),  $\beta$ -glucanos e quitina (polímeros estruturais) (Kalač, 2009). O manitol e a trealose (Figura 12) são, respectivamente, o derivado de açúcar e o açúcar mais abundante nos cogumelos (Barros et al., 2007a; 2008b).



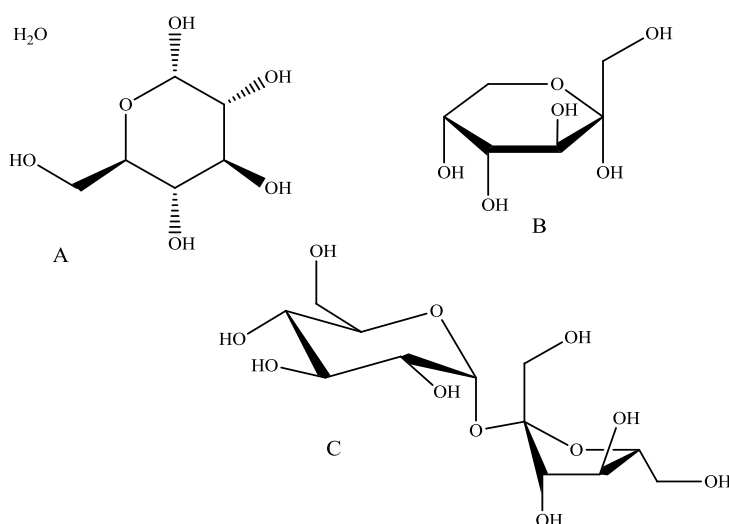
**Figura 13.** Estrutura química da trealose (A) constituída por duas unidades de D-glucose, açúcar não redutor, e do manitol (B) açúcar-álcool derivado de D-manose.

O manitol, sendo redutor, exibe alguma actividade captadora de espécies reactivas de oxigénio, contudo os mecanismos envolvidos não estão completamente entendidos. Estudos recentes demonstraram que o manitol tem capacidades osmoprotectoras, desintoxicando as células das ROS (Molassiotis et al., 2006).

A trealose tem capacidade protectora de membranas e macromoléculas, contudo não se sabe se a eliminação de ROS é directa ou através da protecção de enzimas antioxidantes (Luo et al., 2008).

Foram também encontrados outros açúcares em cogumelos, nomeadamente a frutose, a glucose e a sacarose (Figura 13). A frutose, sendo um açúcar redutor, tem

capacidade antioxidante, ao elevar a quantidade de urato no plasma sanguíneo após consumo de maçãs (Lotito & Frei, 2004). A glucose, sendo um monossacárido redutor é essencial aos organismos vivos, sendo a sua principal fonte de energia. Porém, a sua ingestão em excesso pode levar a doenças como a diabetes e à sobre produção de ROS, num efeito pró-oxidante (Wang et al., 2011). A sacarose, apesar de não ser um açúcar redutor e ter surgido na indústria alimentar apenas no século XIX, encontra-se em muitos alimentos. Apesar de não haver conclusões definitivas acerca do risco do consumo em doses moderadas, a ingestão de grandes quantidades de sacarose pode levar a problemas metabólicos e ao aumento do stress oxidativo (Robert et al., 2008).



**Figura 14.** Estrutura química da glucose (A), açúcar redutor, da frutose (B) açúcar redutor e sacarose (C), constituído por uma unidade de D-glucose e uma de frutose, açúcar não redutor.

### 2.8.3.2 Metodologia

Colocaram-se, em tubos de Falcon, 150 a 300 mg de amostras de meio de cultura, raízes e micélio. A estas amostras, adicionou-se 1 ml de melezitose (PI, 30 mg/ml) e 40 ml de etanol 80%. Os tubos de Falcon foram colocados num banho termostaticado a 80 °C durante 1,5h, agitando-os a cada 15 min. Posteriormente filtraram-se as amostras através de papel Whatman nº 4 e os extractos etanólicos foram transferidos para um balão de fundo redondo de 250 ml evaporando-se o etanol num evaporador rotativo a 40 °C. A fase orgânica foi lavada 3 vezes com éter dietílico (10 ml) numa ampola de decantação. A fase aquosa resultante foi depois evaporada de

forma a remover o éter. Após perfazer os extractos com água até 5 ml, filtrou-se (0,22 µm) e analisou-se por HPLC.

O HPLC referido na secção anterior foi acoplado a um detector de índice de refração (RI, Knauer Smartline 2300) de acordo com o implementado e optimizado no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada (Helena et al., 2009), utilizando a melezitose como padrão interno (PI). A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna Eurosphere 100-5 NH<sub>2</sub> (4,6 × 250mm, 5 mm, Knauer) a operar a 30 °C. A fase móvel consistiu numa mistura de acetonitrilo:água 70:30 (v/v) a um fluxo de 1 ml/min. Os compostos foram determinados por comparação com padrões comerciais. A quantificação foi obtida utilizando o método do padrão interno (PI) e o conteúdo em açúcares foi expresso em g por 100 g de massa seca (dw).

## 2.9. Análise estatística

Realizou-se uma análise de variância (ANOVA) com soma de quadrados tipo III, utilizando o procedimento GLM (Modelo Linear Generalizado) do “software” SPSS, na versão 18.0 (SPSS, Inc.). Todas as variáveis dependentes foram analisadas utilizando uma ANOVA a 2 factores, sendo os mais importantes o “elemento da cultura” (raiz de *Pinus pinaster*, micélio e meio de cultura) e o “período de co-cultura” (0, 6, 24 e 72h). Como foi confirmada uma interacção significativa em todos os testes (“elemento da cultura × período de co-cultura”), os dois factores foram avaliados simultaneamente por traçado das médias marginais estimadas para todos os níveis de todos os factores. Utilizou-se a análise discriminante linear (LDA) para classificar os três elementos da cultura, bem como os quatro períodos de co-cultura de acordo com os resultados da sua actividade antioxidante e do conteúdo em fenóis, açúcares e tocoferóis. A técnica *stepwise* foi utilizada para a selecção de variáveis, em conjunto com o método do  $\lambda$  de Wilks com as probabilidades comuns de F (3,84 para a variável ser seleccionada e 2,71 para a variável ser removida). Este procedimento utiliza uma combinação de selecção progressiva e eliminação regressiva, na qual a selecção de uma nova variável a ser incluída no modelo é precedida pela verificação da significância de todas as variáveis previamente seleccionadas (Rencher, 1995; Maroco, 2003; López et al., 2008). Com esta abordagem, é possível identificar as variáveis significantes na actividade antioxidante e nos conteúdos em fenóis, açúcares e tocoferóis de cada amostra. O teste

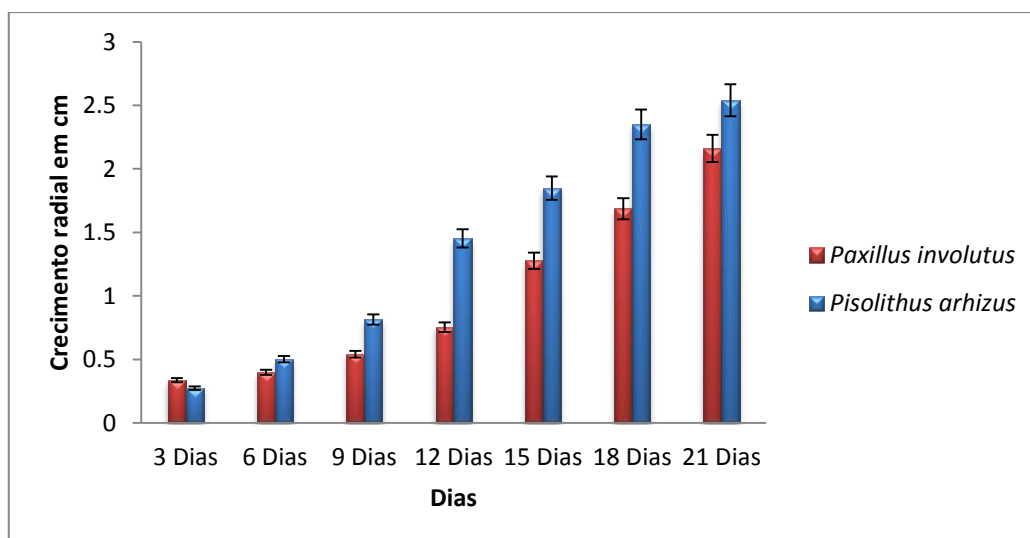


do  $\lambda$  de Wilks foi aplicado para verificar quais as funções canónicas que eram significantes. Foi ainda efectuado um processo de validação cruzada “*leaving-one-out*” para determinar o desempenho do modelo. Todos os testes estatísticos foram efectuados com um nível de significância de 5%, com o “*software*” SPSS referido acima.

### III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em trabalhos anteriores do nosso grupo de investigação, as associações simbióticas entre fungos (micorrízicos) e *Pinus pinaster* foram estudadas com diferentes períodos de co-cultura, 45 dias e 48h (Reis et al., 2011b, 2012). O fungo *Pisolithus arhizus* revelou ser mais compatível com *Pinus pinaster* do que *Paxillus involutus* a nível da actividade antioxidante, pois este último registou um aumento após 48 horas de contacto, enquanto que *Pisolithus arhizus* não sofreu alterações (Reis et al., 2011b; Reis et al., 2012). Tendo em conta que os mecanismos de produção de antioxidantes ainda não são completamente conhecidos, o presente estudo centrou-se nos estádios iniciais da micorrização, às 0, 6 e 24h. Um aumento da actividade antioxidante nos estádios iniciais poderia ser indicativo de um mecanismo de resposta aos níveis maiores de stresse oxidativo que ocorrem enquanto a planta não reconhece o fungo como uma espécie benéfica. Um período adicional de 72 horas de contacto foi também testado para verificar se a resposta química seria similar à das horas anteriores.

Todos os fungos têm ritmos de crescimento e necessidades nutricionais variadas. Assim, antes de se realizar a co-cultura entre o *Pinus pinaster* e os fungos, estes foram deixados a crescer durante 21 dias, de modo a produzir micélio com tamanho suficiente e em fase de crescimento activo, para as raízes serem colocadas em contacto com eles (Figura 15). *Pisolithus arhizus* apresentou melhores taxas de crescimento nas condições de cultura descritas anteriormente, registando um crescimento radial significativamente superior a *Paxillus involutus* (Fig. 15).



**Figura 15.** Crescimento radial de *Pisolithus arhizus* e *Paxillus involutus*.

As diferentes compatibilidades entre plantas e fungos podem ser aproveitadas com propósitos benéficos. Se o fungo induzir respostas mais severas, as moléculas antioxidantes podem ser purificadas a partir do meio de cultura; neste caso, seria importante definir o período de contacto para interromper a simbiose de modo a maximizar o rendimento da produção dos compostos bioactivos. Por outro lado, se o fungo não causar uma reacção significativa na planta, pode indicar uma elevada compatibilidade entre ambos, e poderá ter interesse em programas de reflorestação.

Os resultados obtidos na avaliação da actividade antioxidante foram sistematizados em duas tabelas (Tabela 3, Tabela 4), correspondentes a cada um dos sistemas de micorrização.

**Tabela 3.** Valores de EC<sub>50</sub> da actividade antioxidante (mg/ml) e conteúdo em fenóis para a micorrização entre *Pisolithus arhizus* e a raiz de *Pinus pinaster*. n=12

Amostra	Actividade		Inibição da descoloração do β-caroteno	Inibição da peroxidação lipídica (TBARS)	Fenóis totais
	captadora de radicais DPPH	Poder redutor			
(R+Pa+M)0	0.153±0.001	0.098±0.001	0.55±0.03	0.0070±0.0001	250±5
(Pa+R+M)0	0.77±0.02	0.63±0.01	0.47±0.04	0.026±0.002	189±1
(M+Pa+R)0	79±4	23.4±0.1	2±1	0.41±0.01	3.68±0.01
(R+Pa+M)6	0.13±0.01	0.100±0.001	0.67±0.02	0.0249±0.0001	218±3
(Pa+R+M)6	0.99±0.05	0.80±0.02	0.32±0.01	0.065±0.001	99±2
(M+Pa+R)6	109±3	30.2±0.3	8.0±0.4	1.4±0.5	2.4±0.1
(R+Pa+M)24	0.41±0.01	0.146±0.001	1.15±0.01	0.094±0.003	140±10
(Pa+R+M)24	0.75±0.04	0.88±0.01	0.24±0.02	0.038±0.003	103±6
(M+Pa+R)24	47±4	15.0±0.2	31±3	6±2	2.0±0.1
(R+Pa+M)72	0.22±0.01	0.17±0.01	0.6±0.3	0.220±0.004	186±5
(Pa+R+M)72	1.4±0.1	0.82±0.01	0.8±0.1	0.1223±0.0003	108±10
(M+Pa+R)72	86±1	105±1	1.53±0.02	9.3±0.4	3.0±0.5

R = Raiz de *Pinus pinaster*; Pa = *Pisolithus arhizus*; M = Meio de cultura. A letra indicada em primeiro lugar representa a amostra analisada. Por exemplo, (R+Pa+M)0 representa a análise da raiz de *Pinus pinaster* às 0 horas (controlo).

**Tabela 4.** Valores de EC<sub>50</sub> da actividade antioxidante (mg/ml) e conteúdo em fenóis para a micorrização entre *Paxillus involutus* e a raiz de *Pinus pinaster*. n=12

Amostra	Actividade		Inibição da descoloração do β-caroteno	Inibição da peroxidação lipídica (TBARS)	Fenóis totais
	captadora de radicais DPPH	Poder redutor			
(R+Pi+M)0	0,153±0,001	0,098±0,001	0,55±0,03	0,0070±0,0001	250±5
(Pi+R+M)0	0,17±0,01	0,27±0,01	0,150±0,004	0,01±0,01	184±7
(M+Pi+R)0	8±1	9,6±0,1	6,7±0,3	10±2	4,7±0,1
(R+Pi+M)6	0,57±0,01	0,188±0,001	1,43±0,03	0,017±0,001	86±1
(Pi+R+M)6	0,66±0,05	0,123±0,002	0,32±0,02	0,017±0,001	371±22
(M+Pi+R)6	13±1	20,1±0,5	6,9±0,3	13±3	6,4±0,1
(R+Pi+M)24	0,87±0,01	0,41±0,02	0,145±0,003	0,0045±0,0001	83±9
(Pi+R+M)24	0,34±0,01	0,169±0,002	0,84±0,02	0,12±0,03	290±1
(M+Pi+R)24	6,7±0,4	7,79±0,02	6±1	11±1	6,2±0,3
(R+Pi+M)72	1,0±0,1	0,51±0,01	0,9±0,1	0,0169±0,0003	79,6±0,2
(Pi+R+M)72	0,3±0,1	0,18±0,01	0,13±0,03	0,13±0,01	198±21
(M+Pi+R)72	6±1	6,33±0,04	6,5±0,2	24±2	6,9±0,2

R = Raiz de *Pinus pinaster*; Pi = *Paxillus involutus*; M = Meio de cultura. A letra indicada em primeiro lugar representa a amostra analisada. Por exemplo, (Pi+R+M)24 representa a análise do fungo *Paxillus involutus* às 24h de contacto.

Uma vez que neste trabalho estão em análise dois factores, período (CP) e elemento de co-cultura (CE), a análise dos resultados exigiu um tratamento estatístico específico que conduziu a uma outra forma de apresentar os dados (Tabela 5). Os resultados são apresentados como valor médio de cada elemento da cultura (CE) em todos os períodos de co-cultura (CP), bem como valor médio de todos os elementos da cultura em cada período. Assim, a apresentação dos resultados nesta forma permite compreender melhor os efeitos de cada factor (CE e CP) de uma forma independente, evitando resultados que possam ser influenciados pela interacção entre os dois factores principais. Este procedimento foi adoptado para todos os parâmetros analisados e respectivas tabelas de resultados.

**Tabela 5.** Valores de  $EC_{50}$  da actividade antioxidante (mg/ml), conteúdo em fenóis (mg/ml) obtidos dos elementos da cultura (CE). Os resultados são apresentados como média  $\pm$ SD (n=27, para cada período de co-cultura (CP); n=36 para cada elemento da cultura).

		Actividade captadora de radicais DPPH	Poder redutor	Inibição da descoloração do $\beta$ -caroteno	Inibição da peroxidação lipídica (TBARS)	Fenóis totais
<i>Pisolithus arhizus</i>						
CP	0 h	27 $\pm$ 38	8 $\pm$ 11	1 $\pm$ 1	0,1 $\pm$ 0,2	148 $\pm$ 107
	6 h	37 $\pm$ 52	10 $\pm$ 14	3 $\pm$ 4	1 $\pm$ 1	107 $\pm$ 90
	24 h	16 $\pm$ 23	5 $\pm$ 7	11 $\pm$ 15	2 $\pm$ 3	82 $\pm$ 60
	72 h	29 $\pm$ 41	35 $\pm$ 50	1,0 $\pm$ 0,5	3 $\pm$ 4	99 $\pm$ 77
	<i>p</i> -value	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CE	Raiz	0,2 $\pm$ 0,1	0,13 $\pm$ 0,03	0,7 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,1	199 $\pm$ 42
	Micélio	1,0 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,2	0,06 $\pm$ 0,04	125 $\pm$ 38
	Meio Cultura	80 $\pm$ 22	43 $\pm$ 37	11 $\pm$ 12	4 $\pm$ 4	3 $\pm$ 1
	<i>p</i> -value	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CP $\times$ CE	<i>p</i> -value	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>Paxillus involutus</i>						
CP	0 h	3 $\pm$ 4	3 $\pm$ 4	2 $\pm$ 3	3 $\pm$ 5	146 $\pm$ 106
	6 h	5 $\pm$ 6	7 $\pm$ 10	3 $\pm$ 3	4 $\pm$ 6	154 $\pm$ 160
	24 h	3 $\pm$ 3	3 $\pm$ 4	2 $\pm$ 3	4 $\pm$ 5	126 $\pm$ 122
	72 h	3 $\pm$ 3	2 $\pm$ 3	3 $\pm$ 3	8 $\pm$ 11	95 $\pm$ 81
	<i>p</i> -value	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CE	Raiz	0,6 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,5	0,01 $\pm$ 0,01	125 $\pm$ 74
	Micélio	0,4 $\pm$ 0,2	0,18 $\pm$ 0,05	0,4 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,1	261 $\pm$ 78
	Meio Cultura	9 $\pm$ 3	11 $\pm$ 5	7 $\pm$ 1	14 $\pm$ 6	6 $\pm$ 1
	<i>p</i> -value	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CP $\times$ CE	<i>p</i> -value	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Os resultados mostram que a interacção CP $\times$ CE foi uma fonte de variação significativa para todos os parâmetros avaliados ( $p < 0,001$ ). Assim sendo, apesar das médias dos mínimos quadrados serem apresentadas para os efeitos principais, não foram realizadas comparações múltiplas. Além disso, ambos os factores principais (CP e CE) revelaram efeito significativo ( $p < 0,001$ ). Porém, a partir da análise dos gráficos representativos das médias marginais estimadas (apresentados apenas em casos

específicos), algumas conclusões gerais podem ser retiradas para cada uma das variáveis.

Por exemplo, na co-cultura de *Pisolithus arhizus* e *Pinus pinaster*, a actividade antioxidante permaneceu praticamente constante nas raízes de *Pinus pinaster*, enquanto que o micélio apresentou uma diminuição considerável (aumento dos valores de EC<sub>50</sub>) às 72 horas, depois de se manter estável durante as primeiras 24 horas. Em relação ao meio de cultura, os resultados foram análogos aos do micélio, com excepção do ensaio da inibição da descoloração do β-caroteno. Este resultado pode indicar que após uma fase inicial de adaptação fisiológica, traduzido por ligeiras variações na actividade antioxidante, às 72 horas, a planta já reconheceu o fungo como sendo benéfico. Como esta conclusão é apenas evidente nos gráficos das médias marginais estimadas e não na tabela 6, é importante referir que estas diferenças estão maioritariamente relacionadas com o meio de cultura.

Para a co-cultura de *Paxillus involutus* e *Pinus pinaster*, os valores de EC<sub>50</sub> obtidos nos ensaios da actividade captadora de radicais DPPH e poder redutor foram inferiores (especialmente no meio de cultura) aos encontrados na outra co-cultura (Tabela 5), o que está de acordo com o descrito por Reis et al. (2011b, 2012) e com a sua maior quantidade de fenóis (Tabela 5). Apesar de algumas semelhanças na actividade antioxidante de cada micorrização, existem resultados particulares que podem diferenciar a compatibilidade dos simbiontes. Por exemplo, enquanto que os valores de EC<sub>50</sub> tendem a aumentar das 24 para as 72 horas em *Pisolithus arhizus* (excepto na inibição da descoloração do β-caroteno), os mesmos valores permaneceram aproximadamente inalterados em *Paxillus involutus* para o mesmo período (à excepção do ensaio TBARS) (Tabela 5). Ainda assim, em ambos os casos, a actividade antioxidante foi quase constante em cada um dos micélios e na raiz, variando apenas no meio de cultura. Enquanto que o conteúdo máximo em fenóis se verificou às 0 horas na co-cultura entre *Pisolithus arhizus* e *Pinus pinaster* (148 mg EAG/g), esse valor apenas se registou às 6 horas para o caso de *Paxillus involutus* (154 mg EAG/g) (Tabela 5). Este facto pode indicar que a actividade antioxidante não se deve apenas ao conteúdo fenólico, pois tanto as raízes como o micélio mantiveram o seu potencial antioxidante apesar da variação do conteúdo em fenóis. Além disso, o aumento da actividade antioxidante do meio de cultura não correspondeu a uma maior concentração fenólica.

As tabelas 6, 7 apresentam os resultados globais dos tocoferóis para cada sistema de micorrização, enquanto que a tabela 8 representa os resultados após o mesmo tratamento estatístico referido anteriormente.

**Tabela 6.** Resultados globais dos tocoferóis para a micorrização entre *Pisolithus arhizus* e *Pinus pinaster*. N=12.

Amostra	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$
(R+Pa+M)0	4,30±0,24	0,06±0,00	0,54±0,02	25,93±0,43
(Pa+R+M)0	0,02±0,00	0,30±0,01	42,74±0,26	0,03±0,00
(M+Pa+R)0	0,01±0,00	0,07±0,01	0,31±0,00	0,01±0,00
(R+Pa+M)6	1,42±0,06	0,01±0,00	0,17±0,02	2,72±0,13
(Pa+R+M)6	0,63±0,01	0,11±0,03	27,75±1,18	0,02±0,01
(M+Pa+R)6	0,00±0,00	0,07±0,00	0,94±0,05	0,62±0,02
(R+Pa+M)24	1,38±0,04	0,01±0,00	0,017±0,04	3,37±0,14
(Pa+R+M)24	0,05±0,01	0,09±0,01	36,44±0,55	0,14±0,02
(M+Pa+R)24	0,10±0,00	0,04±0,00	0,08±0,00	0,01±0,00
(R+Pa+M)72	26,02±0,83	1,07±0,02	0,16±0,02	8,30±0,41
(Pa+R+M)72	0,10±0,00	0,06±0,02	44,96±1,38	0,02±0,01
(M+Pa+R)72	0,01±0,00	0,07±0,01	0,57±0,05	0,04±0,01

R = Raiz de *Pinus pinaster*; Pi = *Pisolithus arhizus*; M = Meio de cultura. A letra indicada em primeiro lugar representa a amostra analisada. Por exemplo, (Pa+R+M)72 representa a análise do fungo *Paxillus involutus* às 72h de contacto.

**Tabela 7.** Resultados globais dos tocoferóis para a micorrização entre *Paxillus involutus* e *Pinus pinaster*. N=12.

Amostra	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$
(R+Pi+M)0	4,30 ± 0,24	0,06 ± 0,00	0,54 ± 0,02	25,93 ± 0,43
(Pi+R+M)0	0,01±0,00	0,00±0,00	0,55±0,00	0,06±0,01
(M+Pi+R)0	0,000,00	0,000,00	0,290,04	0,000,00
(R+Pi+M)6	2,14±0,10	0,00±0,00	0,42±0,03	5,04±0,12
(Pi+R+M)6	0,00±0,00	0,00±0,00	1,33±0,09	0,04 ±0,00
(M+Pi+R)6	0,00±0,00	0,00±0,00	0,009±0,00	0,00±0,00
(R+Pi+M)24	1,68±0,08	0,00±0,00	0,49±0,04	3,27±0,11
(Pi+R+M)24	0,00±0,00	0,03±0,01	1,47±0,01	0,02±0,00
(M+Pi+R)24	0,00±0,00	0,00±0,00	0,75±0,00	0,00±0,00
(R+Pi+M)72	1,63±0,01	0,00±0,00	0,39±0,03	3,90±0,21
(Pi+R+M)72	0,01±0,00	0,03±0,00	2,01±0,00	0,01±0,00
(M+Pi+R)72	0,00±0,00	0,00±0,00	0,04±0,02	0,00±0,00

R = Raiz de *Pinus pinaster*; Pi = *Paxillus involutus*; M = Meio de cultura. A letra indicada em primeiro lugar representa a amostra analisada. Por exemplo, (M+Pi+R)6 representa a análise do meio de cultura à 6h de contacto.

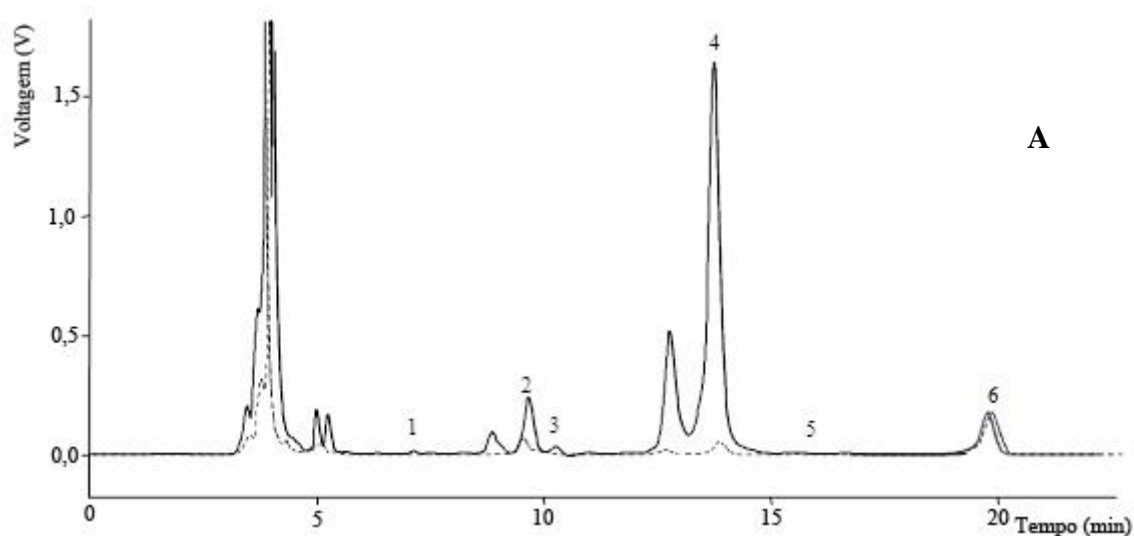
**Tabela 8.** Conteúdo em tocoferóis (mg/100 g dw) nos elementos da cultura (CE). Os resultados são apresentados em média±SD (n=27, para cada período de co-cultura (CP); n=36 para cada elemento da cultura).

		$\alpha$ -Tocoferol	$\beta$ -Tocoferol	$\gamma$ -Tocoferol	$\delta$ -Tocoferol	Tocoferóis totais
<i>Pisolithus arhizus</i>						
CP	0 h	1±2	0,1±0,1	15±20	9±12	25±18
	6 h	1±1	0,06±0,04	10±13	1±1	11±12
	24 h	1±1	0,05±0,03	12±17	1±2	14±16
	72 h	9±12	0,4±0,5	15±21	3±4	27±19
	<i>p</i> -value	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CE	Raiz	8±10	0,3±0,5	0,3±0,2	10±10	19±15
	Micélio	0,2±0,2	0,1±0,1	38±7	0,05±0,05	38±7
	Meio Cultura	0,03±0,04	0,06±0,02	0,5±0,3	0,2±0,3	0,7±0,5
	<i>p</i> -value	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CP × CE	<i>p</i> -value	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>Paxillus involutus</i>						
CP	0 h	1±2	0,02±0,03	0,5±0,1	9±12	11±15
	6 h	1±1	nd	0,6±0,5	2±2	3±3
	24 h	1±1	0,01±0,01	0,9±0,4	1±2	3±2
	72 h	1±1	0,01±0,01	1±1	1±2	3±2
	<i>p</i> -value	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CE	Raiz	2±1	0,01±0,02	0,5±0,1	10±10	12±11
	Micélio	0,004±0,001	0,01±0,01	1,3±0,5	0,03±0,02	1,4±0,5
	Meio Cultura	nd	nd	0,3±0,3	nd	0,3±0,3
	<i>p</i> -value	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CP × CE	<i>p</i> -value	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

\*nd – Não detectado



Na raiz de *Pinus pinaster*, os vitâmeros predominantes foram o  $\alpha$ - e o  $\delta$ -tocoferol, enquanto nos micélios foi o  $\gamma$ -tocoferol, embora numa maior concentração no micélio de *Pisolithus arhizus* (Figura 16, Tabela 8).



**Figura 16.** Perfil de tocoferóis do micélio de *Pisolithus arhizus* (-) e *Paxillus involutus* (--) em co-cultura com raízes de *Pinus pinaster* durante 24h (1-  $\alpha$ -tocoferol; 2- BHT; 3-  $\beta$ -tocoferol; 4-  $\gamma$ -tocoferol; 5-  $\delta$ -tocoferol; 6- PI).

Um resultado interessante foi encontrado ao longo dos períodos de co-cultura (CP), e relaciona-se com a grande variação de  $\alpha$ - e  $\delta$ -tocoferol na co-cultura de *Pisolithus arhizus* e *Pinus pinaster* (Tabela 8); já no caso do *Paxillus involutus*, apenas o  $\delta$ -tocoferol revelou um decréscimo acentuado ao longo das diferentes horas de contacto. Isto pode indicar que a dinâmica metabólica da vitamina E pode ser influenciada pelas espécies simbiotes. Na generalidade, os tocoferóis totais não variaram nos meios de cultura de ambos os sistemas micorrízicos. No caso da co-cultura entre *Paxillus involutus* e *Pinus pinaster* o elemento com mais tocoferóis foi a raiz de *Pinus pinaster*, enquanto que no caso do *Pisolithus arhizus* o que apresentou maior quantidade de tocoferóis foi o micélio (Tabela 8).

As tabelas 9 e 10 apresentam os resultados globais dos açúcares para cada sistema de micorrização, enquanto que a tabela 11 representa os resultados após o tratamento estatístico referido anteriormente.

**Tabela 9.** Resultados globais dos açúcares para a micorrização entre *Pisolithus arhizus* e *Pinus pinaster*.

Amostra	Frutose	Glucose	Manitol	Sacarose	Trealose
(R+Pa+M)0	3,25±0,18	6,80±0,30	0,83±0,18	1,89±0,21	0,00±0,00
(Pa+R+M)0	0,00±0,00	2,64±0,05	0,00±0,00	0,00±0,00	4,86±0,26
(M+Pa+R)0	0,00±0,00	21,45±0,01	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
(R+Pa+M)6	4,10±0,08	3,87±0,07	0,52±0,05	1,67±0,10	0,00±0,00
(Pa+R+M)6	0,00±0,00	3,32±0,03	0,00±0,00	0,00±0,00	4,00±0,09
(M+Pa+R)6	0,00±0,00	25,29±0,41	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
(R+Pa+M)24	5,17±0,01	4,40±0,09	0,79±0,05	1,63±0,09	0,00±0,00
(Pa+R+M)24	0,00±0,00	3,06±0,04	0,00±0,00	0,00±0,00	2,86±0,04
(M+Pa+R)24	0,00±0,00	26,26±0,67	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
(R+Pa+M)72	9,11±0,02	6,26±0,07	0,37±0,06	2,35±0,11	0,00±0,00
(Pa+R+M)72	0,00±0,00	1,93±0,08	0,00±0,00	0,00±0,00	3,61±0,14
(M+Pa+R)72	0,00±0,00	24,40±0,02	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

R = Raiz de *Pinus pinaster*; Pa = *Pisolithus arhizus*; M = Meio de cultura.

**Tabela 10.** Resultados globais dos açúcares para a micorrização entre *Paxillus involutus* e *Pinus pinaster*.

Amostra	Frutose	Glucose	Manitol	Sacarose	Trealose
(R+Pi+M)0	3,25±0,18	6,80±0,30	0,83±0,18	1,89±0,21	0,00±0,00
(Pi+R+M)0	0,00±0,00	0,42±0,02	0,74±0,03	0,00±0,00	0,59±0,04
(M+Pi+R)0	0,00±0,00	26,7±0,47	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
(R+Pi+M)6	0,10±0,01	0,10±0,01	0,09±0,00	0,24±0,06	0,09±0,01
(Pi+R+M)6	0,00±0,00	0,42±0,00	0,90±0,00	0,00±0,00	0,91±0,00
(M+Pi+R)6	0,00±0,00	25,89±0,27	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
(R+Pi+M)24	0,12±0,01	0,10±0,00	0,32±0,00	0,09±0,01	0,75±0,01
(Pi+R+M)24	0,00±0,00	0,40±0,04	0,93±0,10	0,00±0,00	0,21±0,00
(M+Pi+R)24	0,00±0,00	28,14±0,58	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
(R+Pi+M)72	0,14±0,02	0,18±0,02	0,12±0,02	0,62±0,02	0,08±0,00
(Pi+R+M)72	0,00±0,00	0,64±0,00	0,82±0,00	0,00±0,00	0,14±0,03
(M+Pi+R)72	0,00±0,00	27,41±0,15	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

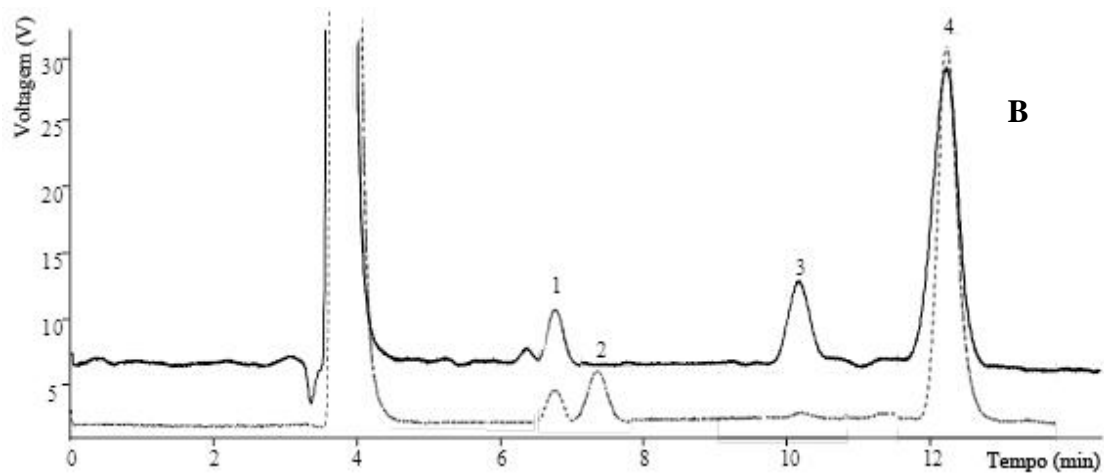
R = Raiz de *Pinus pinaster*; Pi = *Paxillus involutus*; M = Meio de cultura.

**Tabela 11.** Teor em açúcares (g/100 g dw) nos elementos da cultura (CE). Os resultados são apresentados em média±SD (n=27, para cada período de co-cultura (CP); n=36 para cada elemento da cultura).

		Frutose	Glucose	Manitol	Sacarose	Trealose	Açúcares totais
<i>Pisolithus arhizus</i>							
CP	0 h	1±2	10±8	0,3±0,4	1±1	2±2	14±6
	6 h	1±2	11±10	0,2±0,2	1±1	1±2	14±8
	24 h	2±2	11±11	0,3±0,4	1±1	1±1	15±9
	72 h	3±4	11±10	0,1±0,2	1±1	1±2	16±8
	<i>p</i> -value	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CE	Raiz	5±2	5±1	0,6±0,2	1,9±0,3	nd	13±3
	Micélio	nd	2,7±0,5	nd	nd	4±1	7±1
	Meio Cultura	nd	24±2	nd	nd	nd	24±2
	<i>p</i> -value	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CP × CE	<i>p</i> -value	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>Paxillus involutus</i>							
CP	0 h	1±2	11±11	0,5±0,4	1±1	0,2±0,3	14±10
	6 h	0,03±0,05	9±12	0,3±0,4	0,1±0,1	0,3±0,4	10±12
	24 h	0,04±0,06	10±13	0,3±0,4	0,1±0,1	0,1±0,1	10±13
	72 h	0,05±0,07	9±13	0,3±0,4	0,2±0,3	0,1±0,1	10±12
	<i>p</i> -value	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CE	Raiz	1±1	2±3	0,3±0,3	1±1	0,06±0,04	4±5
	Micélio	nd	0,5±0,1	0,8±0,1	nd	0,5±0,3	1,8±0,3
	Meio Cultura	nd	27±1	nd	nd	nd	27±1
	<i>p</i> -value	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CP × CE	<i>p</i> -value	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

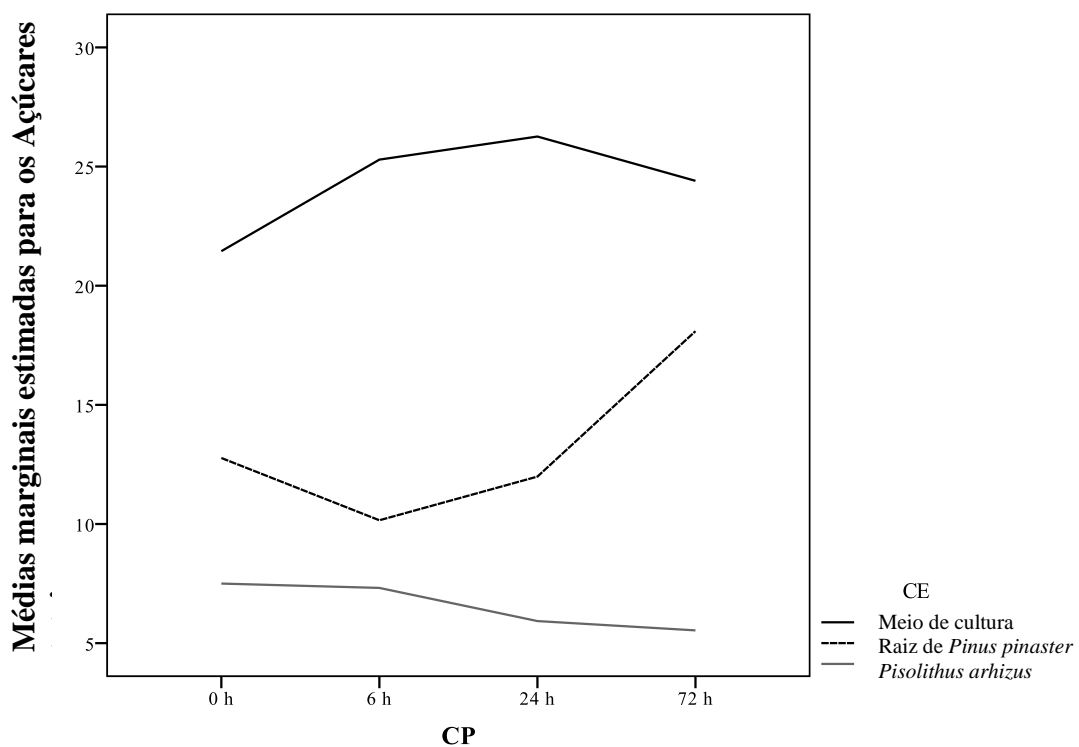
\*nd – Não detectado

Tanto a frutose como a sacarose foram apenas detectadas nas raízes de *Pinus pinaster*, apresentando concentrações mais elevadas na simbiose entre *Pinus pinaster* e o *Pisolithus arhizus* (Tabela 11). Enquanto a frutose aumentou e a sacarose se manteve ao longo do CP para a micorrização entre *Pinus pinaster* e *Pisolithus arhizus*, os dois açúcares foram diminuindo no caso da associação entre *Pinus pinaster* e *Paxillus involutus*. O manitol apenas foi encontrado no micélio de *Paxillus involutus*, enquanto a trealose foi encontrada em ambos os micélios (Figura 17; Tabela 11).



**Figura 17.** Perfil de açúcares do micélio de *Pisolithus arhizus* (-) e *Paxillus involutus* (--) em co-cultura com raízes de *Pinus pinaster* durante 72 horas (1- glucose; 2- manitol; 3- trealose; 4- PI).

Para a associação entre *Paxillus involutus* e *Pinus pinaster*, o manitol foi decrescendo no micélio e não se alterou na raiz, enquanto a trealose aumentou nesta e baixou no micélio. A glucose revelou um comportamento interessante ao longo do CP, demonstrando uma complementaridade entre as raízes de *Pinus pinaster* e o micélio de *Pisolithus arhizus*. Este comportamento também foi notório no caso dos açúcares totais (Figura 18).

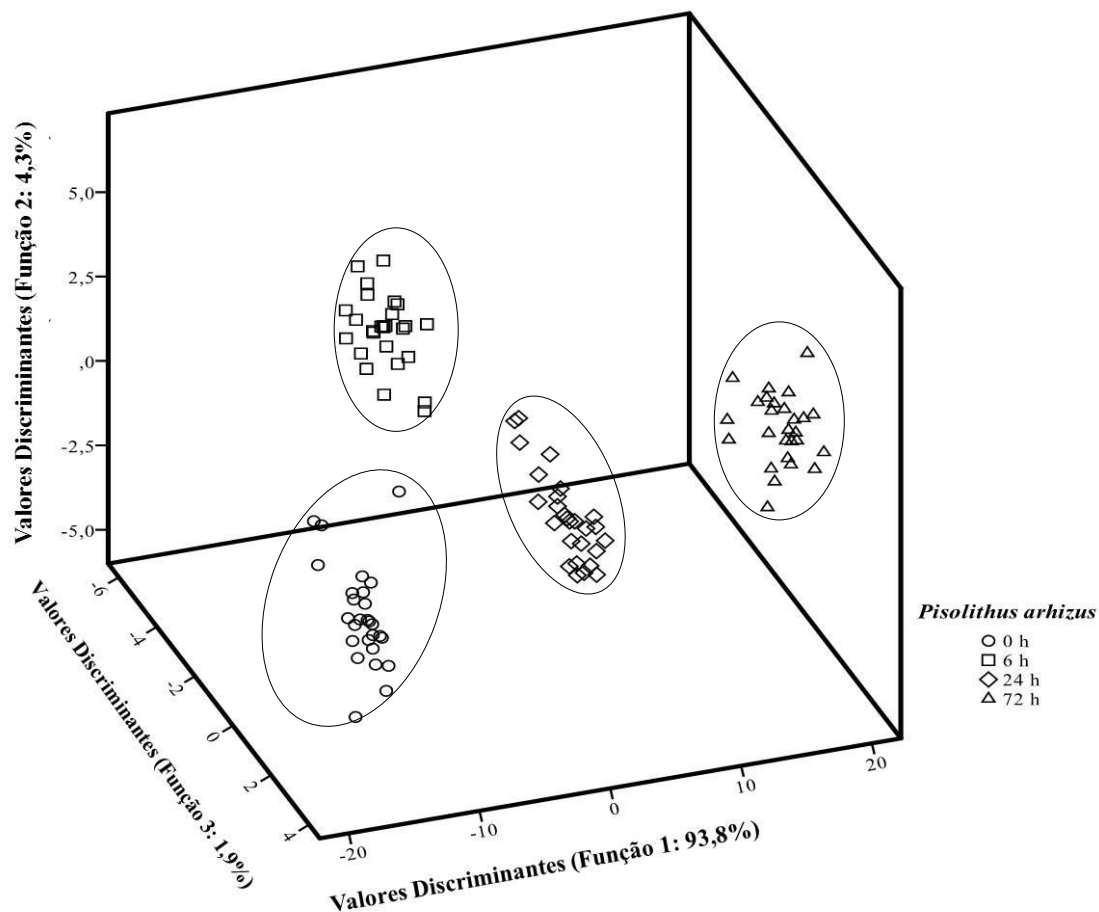


**Figura 18.** Médias marginais estimadas para o conteúdo em açúcares totais nos diferentes elementos da co-cultura (CE).

No caso da co-cultura entre *Paxillus involutus* e *Pinus pinaster* a variação de glucose apenas ocorreu na raiz, e foi tendencialmente diminuindo. Os elementos da simbiose de *Pisolithus arhizus* e *Pinus pinaster* apresentaram uma maior quantidade de açúcares, nomeadamente frutose e trealose (Tabela 11).

Em geral, verificou-se que dois dos parâmetros analisados se mantinham praticamente invariáveis. A actividade antioxidante manteve-se semelhante nas raízes de *Pinus pinaster* e em cada um dos micélios. Por outro lado, a quantidade de tocoferóis (excepto o  $\gamma$ -tocoferol) foi semelhante nos micélios e nos meios de cultura. Esta tendência não foi observada no conteúdo em açúcares, o que pode indicar que as diferenças na resposta química à micorrização estão mais directamente relacionadas com trocas de açúcares (metabolitos primários).

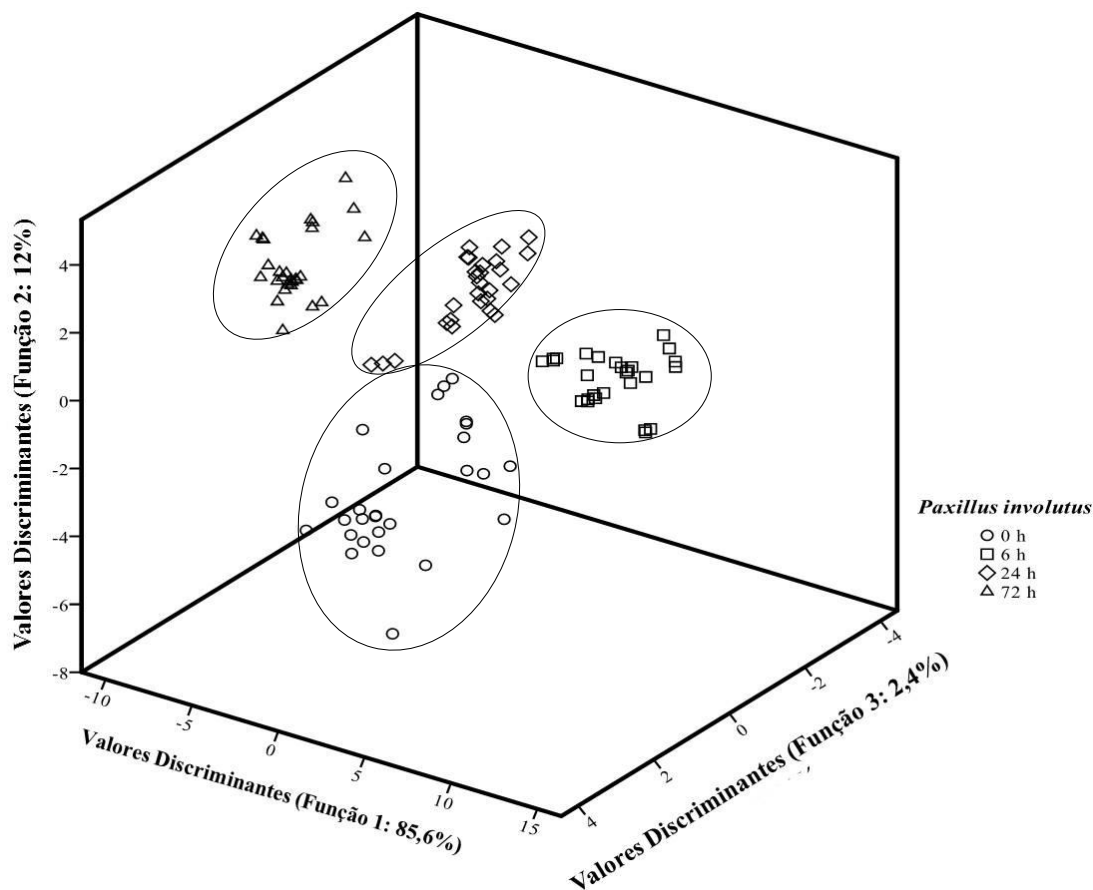
De modo a compreender melhor as diferenças relacionadas com o período de contacto dos simbiontes e as diferenças entre os elementos das co-culturas, foi realizada uma análise linear discriminante (LDA). As diferenças induzidas pelo período de micorrização com *Pinus pinaster* foram facilmente observadas com esta análise, em que quatro “clusters” (correspondentes aos quatro períodos estudados) foram claramente individualizados (Figura 19).



**Figura 19.** Análise canónica dos períodos de co-cultura de *Pisolithus arhizus* com base em todos os parâmetros.

Todos os parâmetros analisados (valores de  $EC_{50}$  da actividade antioxidante e o conteúdo em fenóis, tocoferóis e açúcares) foram usados, resultando num modelo discriminante com três funções significantes ( $p < 0,001$  para o teste  $\lambda$  de Wilks). Estas três funções explicaram 100,0% da variância dos dados experimentais (a primeira explicou 93,8%, a segunda 4,3% e a terceira 1,9%) (Figura 19). Este modelo permitiu classificar correctamente 100,0% das amostras para os grupos originais e 99,1% para o processo de validação cruzada, demonstrando ser muito adequado.

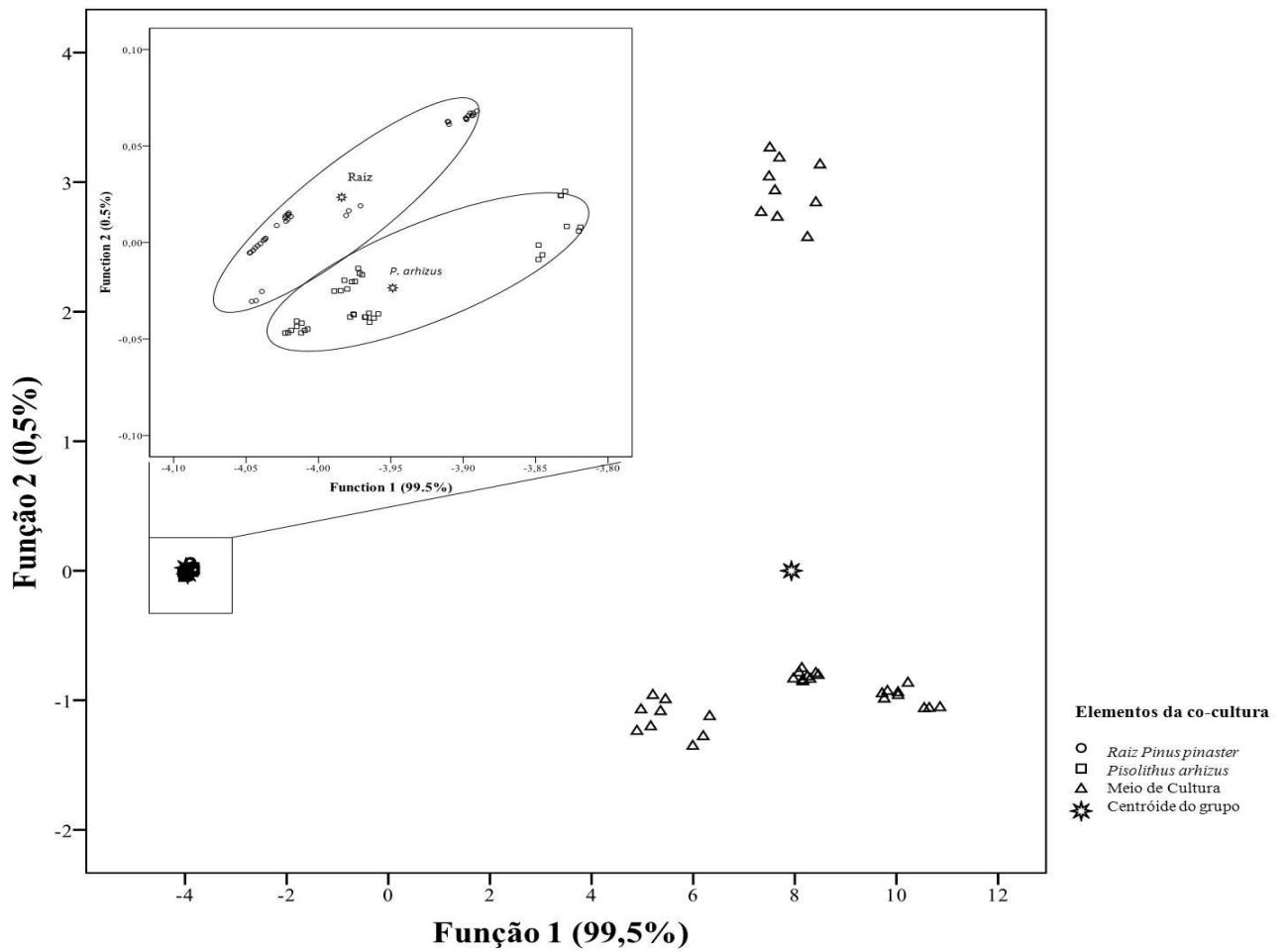
Um resultado semelhante também foi obtido para a co-cultura de *Paxillus involutus* e *Pinus pinaster*. A LDA aplicada também permitiu formar quatro “clusters” individuais após definir três funções significantes ( $p < 0,001$  para o teste  $\lambda$  de Wilks). Isto permitiu explicar mais uma vez 100,0% da variância dos dados experimentais (85,6% para a primeira função, 12% para a segunda e 2,4% para a terceira (Figura 20).



**Figura 20.** Análise canónica dos períodos de co-cultura de *Paxillus involutus* com base em todos os parâmetros.

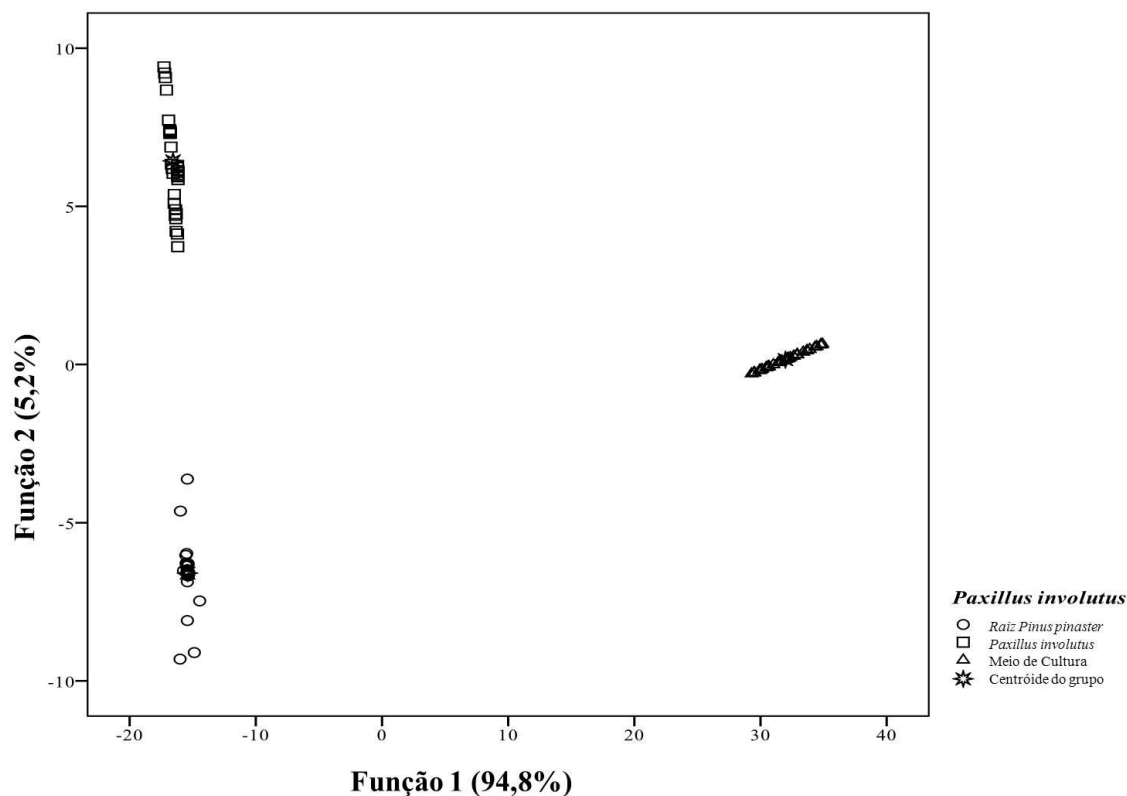
O modelo classificou correctamente 98,1% das amostras para os grupos originais e 96,3% para o procedimento de validação cruzada, revelando-se bastante satisfatório.

Em relação aos elementos da co-cultura parece ter havido uma semelhança ao longo do tempo, especialmente nas propriedades antioxidantes em ambas as co-culturas. Isto indica que a simbiose não afectou as propriedades antioxidantes das espécies estudadas. Ainda assim, os resultados da LDA indicaram pequenas diferenças entre os elementos, o que permitiu diferenciá-los em dois grupos distintos, quer no caso de *Pisolithus arhizus* (Figura 21), quer no caso de *Paxillus involutus* (Figura 22).



**Figura 21.** Análise canónica dos elementos da co-cultura de *Pisolithus arhizus* com *Pinus pinaster* baseado nos valores de  $EC_{50}$  da actividade antioxidante. Devido à proximidade de ambos os elementos, foi adicionada uma escala de expansão.





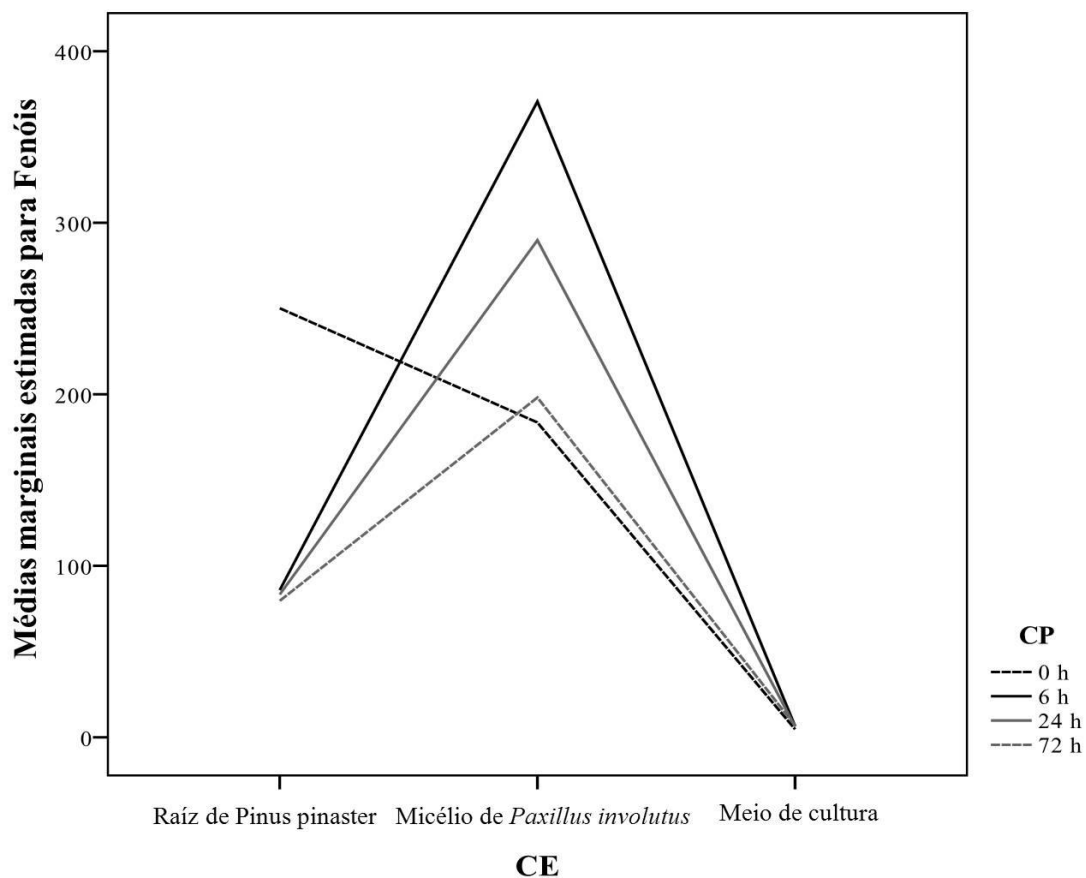
**Figura 22.** Análise canónica dos elementos da co-cultura de *Paxillus involutus* com *Pinus pinaster* baseado no conteúdo em açúcares.

Em ambos os fungos, a LDA definiu duas funções significantes ( $p < 0,001$  para o teste  $\lambda$  de Wilks) que explicaram 100,0% da variância dos dados experimentais. Para o *Paxillus involutus*, o modelo classificou correctamente 90,7% das amostras dos grupos originais e do procedimento de validação cruzada. Um resultado semelhante foi obtido quando a análise foi feita utilizando os tocoferóis (91,7% das amostras para os grupos originais e para o procedimento de validação cruzada foram correctamente classificadas) e açúcares (Figura 22) (100,0% das amostras para os grupos originais e para o procedimento de validação cruzada foram correctamente classificadas). Para *Pisolithus arhizus*, 100% das amostras dos grupos originais bem como do procedimento de validação cruzada foram correctamente classificadas, utilizando os valores de  $EC_{50}$  da actividade antioxidante, de tocoferóis ou açúcares).

## IV. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

### 4.1. Conclusões

Este estudo demonstrou a hipótese sugerida por Reis et al. (2011b,2012) que classificava *Pisolithus arhizus* como sendo mais compatível a nível de micorrização com *Pinus pinaster* do que *Paxillus involutus* pois a actividade antioxidante neste aumentava das 48 para as 72h, enquanto que em *Pisolithus arhizus* essa actividade diminuiu nesse período de tempo, podendo ser indicativo de menos stress oxidativo. Assim, uma potencial utilização para *Paxillus involutus* estará ligada à produção de compostos bioactivos, pois após as 6 horas houve uma grande produção de fenóis (Figura 23), e caso seja este o interesse do seu cultivo com *Pinus pinaster*, a co-cultura deverá ser interrompida nessa altura.



**Figura 23.** Médias marginais estimadas para os fenóis nos diferentes elementos da cultura (CE) durante os períodos de cultura (CP).

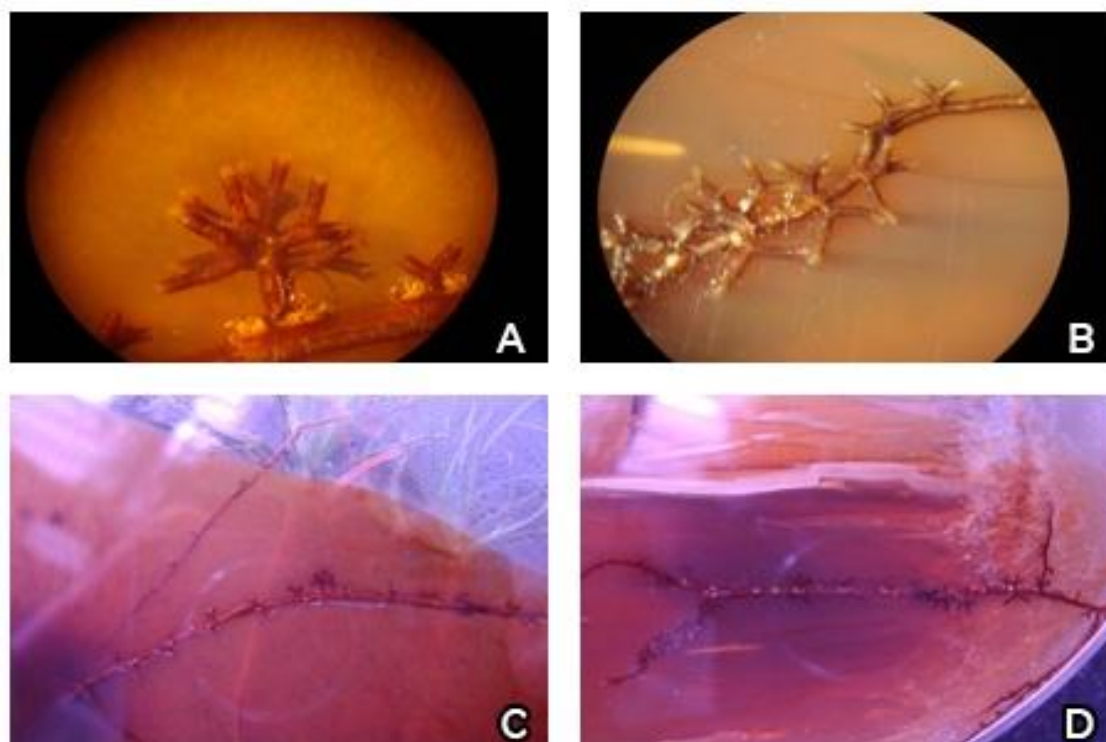
No caso dos tocoferóis, ao nível da raiz de *Pinus pinaster*, os predominantes foram o  $\alpha$ - e o  $\delta$ -tocoferol, enquanto nos micélios foi o  $\gamma$ -tocoferol, contudo numa maior quantidade em *Pisolithus arhizus*, revelando uma maior capacidade de redução do stresse oxidativo. Efectivamente, o nosso grupo de investigação já tinha demonstrado que o micélio deste fungo era uma fonte interessante de  $\gamma$ -tocoferol (Reis et al., 2011b).

Em relação aos açúcares, tanto a sacarose como a frutose apenas foram detectadas nas raízes de *Pinus pinaster*. A trealose foi detectada em ambos os fungos, mas o manitol apenas foi encontrado no micélio de *Paxillus involutus*.

Quimicamente, pode concluir-se que a simbiose entre estes fungos e as raízes de *Pinus pinaster* está ligada a variações de metabolitos primários (açúcares) e secundários (fenóis) tanto em termos temporais como de intensidade. Nessa variação reside a explicação para as diferenças de resposta ao stresse oxidativo e produção de compostos de interesse ao longo dos primeiros estádios da simbiose.

Biológica e ecologicamente, conseguiu provar-se que existe resposta por parte da planta à associação com os fungos, resposta essa que, inicialmente é adversa à presença do fungo, mas à medida que a planta vai reconhecendo os fungos, vai desligando os seus mecanismos de defesa. Essa resposta varia consoante o fungo e o tempo de exposição, provando que as interacções não são estáticas, mas sim dinâmicas e que dependem de ambas as espécies, bem como do ambiente que as rodeia. Uma prova deste dinamismo foi a reacção bastante mais severa da planta quando associada a *Paxillus involutus*.

Após colheita do material biológico para as análises bioquímicas, algumas placas de Petri com a co-cultura planta-fungo de *Pisolithus arhizus* com *Pinus pinaster* e *Paxillus involutus* com *Pinus pinaster*, foram deixadas durante algumas semanas sob as mesmas condições, de modo a avaliar o crescimento em associação. Após esse tempo, registou-se a formação de micorrizas em ambos os fungos (Figura 24) e a ausência de pêlos radiculares, provando que as alterações encontradas na actividade antioxidante, fenóis, tocoferóis e açúcares foram devidas à génese de micorrizas, corroborando os resultados encontrados.



**Figura 24.** Exemplos de micorrizas obtidas nos ensaios. A. Micorriza de *Pisolithus arhizus*. B. Micorriza de *Paxillus involutus*. C. Raiz de *Pinus pinaster* com micorrizas de *Pisolithus arhizus*. D. Raiz de *Pinus pinaster* com micorrizas de *Paxillus involutus*.

#### 4.2. Perspectivas futuras

O presente trabalho procurou aprofundar os conhecimentos acerca da interacção micorrízica entre *Pinus pinaster* e dois fungos ectomicorrízicos, *Pisolithus arhizus* e *Paxillus involutus*, registando alterações a nível de actividade antioxidante e produção de compostos bioactivos às 0, 6, 24 e 72h.

Este trabalho pode ser alargado e aprofundado a vários níveis. O perfil fenólico pode ser obtido, fazendo uma análise de compostos fenólicos por HPLC-DAD/MS (HPLC acoplado a detecção de díodos e espectrometria de massa), uma vez que neste trabalho apenas se determinou o teor de fenóis totais pelo método *Folin-Ciocalteus* que, tal como mencionado anteriormente, apresenta algumas interferências. Por outro lado, podem testar-se outros tempos de contacto de modo a tentar compreender melhor os mecanismos de associação entre a planta e o fungo, (nomeadamente a nível do stresse micorrízico e a nível das interacções moleculares) e, possivelmente detectar uma maior concentração de compostos de interesse. Outra abordagem diferente seria testar novos sistemas de micorrização *in vitro* com outros fungos e plantas, permitindo encontrar

simbiontes que possibilitem reflorestações micorrízicas mais bem sucedidas ou programas de melhoramento de espécies ou até encontrar outras biomoléculas com interesse medicinal, nomeadamente antioxidantes ou anti-tumorais.

## V. BIBLIOGRAFIA

- Alía, R., Martín. S. 2003. EUFORGEN Technical guidelines for genetic conservation and use for maritime pine (*Pinus pinaster*). International Plant Genetic Resources Institute.
- Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J.A. 2004. Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84, 551 – 562.
- Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S., Robards K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183–198.
- Apel, K., Hirt, H. 2004. Reactive Oxygen Species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373 – 399.
- Aydt, H., Turner S. J., Cai W., Low M.Y.H. 2008. Symbiotic simulation systems: An extended definition motivated by symbiosis in biology. 22nd Workshop on Principles of Advanced and Distributed Simulation.
- Benguria, R.L. 1985. *Mil setas ibericas*. Flash Composition S.L. Bilbao.
- Barker, S.J., Tagu, D. 2000. The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbioses. *Journal of Plant Growth Regulation*, 19, 144 – 154.
- Barros, L. , Baptista, P., Correia, D.M., Oliveira, B., Ferreira, I.C.F.R. 2007a. Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal. *Food Chemistry*, 105, 140 – 145.
- Barros, L., Ferreira, M.J., Queirós, B., Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P. 2007b. Total phenols, ascorbic acid,  $\beta$ -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 103, 413 – 419.

- Barros, L., Correia, D.M., Ferreira, I.C.F.R., Baptista P., Santos-Buelga, C. 2008a. Optimization of the determination of tocopherols in *Agaricus sp.* edible mushrooms by a normal phase liquid chromatographic method. *Food Chemistry*, 110, 1046 – 1050.
- Barros, L., Cruz, T., Baptista, P., Estevinho, L.M., Ferreira, I.C.F.R. 2008b. Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2742 – 2747.
- Benguria, R.L. 1985. *Mil setas ibéricas, flash composition*. S.L. Bilbao
- Berker, K.I., Güclü, K., Tor, I., Apak, R. 2007. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, 72, 1157 – 1165.
- Blaudez, D., Botton, B., Chalot, M. 2000. Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Microbiology*, 146, 1109 – 1117.
- Bowman, B. H., Taylor J.W., Brownlee, A.G., Lee, J., Lu, S., et al. 1992. Molecular evolution of the fungi: Relationship of the Basidiomycetes, Ascomycetes, and Chytridiomycetes. *Molecular Biology and Evolution*, 9, 285 – 296.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28, 25 – 30.
- Brundrett, M. 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews*, 79, 473 – 495.
- CAB International. 2002. *Pines of silvicultural importance*. CABI Publishing, United Kingdom.

- Campos, A.N.R., Costa, M.D. 2010. Basidiosporogenesis, meiosis, and post-meiotic mitosis in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus*. *Fungal Genetics and Biology*, 47, 477-483.
- Carlile, M.J., Watkinson, S.C., Gooday, G.W. 2001. *The fungi*. Academic Press, 2nd Edition. Hungary.
- Cavalier-Smith, T. 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biological reviews*, 73, 203 – 266.
- Chambers, S.M., Cairney J.W.G. 1999. *Ectomycorrhizal fungi: Key genera in profile*. Springer. Berlin.
- Corrêa, A., Strasser, R.J., Martins-loução, M.A. 2006. Are mycorrhiza always beneficial? *Plant and Soil*, 279, 65 – 73.
- Courbot, M., Diez, L., Ruotolo, R., Chalot, M., Leroy, P. 2004. Cadmium-responsive thiols in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 7413 – 7417.
- Duñabeitia, M., Rodríguez, N., Salcedo, I., Sarrionandia, E. 2004. Field mycorrhization and its influence on the establishment and development of the seedlings in a broadleaf plantation in the Basque country. *Forest Ecology and Management*, 195, 129 – 139.
- Feofilova, E. P. 2001. The Kingdom fungi: Heterogeneity of physiological and biochemical properties and relationships with plants, animals, and prokaryotes (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 37, 124 – 137.
- Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Abreu, R.M.V. 2009. Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 16, 1543 – 1560.



- Fitter, A.H. 1991. Costs and benefits of mycorrhizas: Implications for functioning under natural conditions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 4, 350 – 355.
- Gaspar, M.J., Lousada, J.L., Rodrigues, J.C., Aguiar, A., Almeida, M.H. 2009. Does selecting for improved growth affect wood quality of *Pinus pinaster* in Portugal? *Forest Ecology and Management*, 258, 115 – 121.
- Grangeia, C., Heleno, S.A., Barros, L., Martins, A., Ferreira, I.C.F.R. 2011. Effects of trophism on nutritional and nutraceutical potential of wild edible mushrooms. *Food Research International*. 44, 1029 – 1035.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, 219, 1 – 14.
- Harvengt, L. 2005. Somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, 77, 107 – 119.
- Heidjen, E.W. 2001. Differential benefits of arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal infection of *Salix repens*. *Mycorrhiza*, 10, 185 – 193.
- Heleno, S.A., Barros, L., Sousa, M.J., Martins, A., Ferreira, I.C.F.R. 2009. Study and characterization of selected nutrients in wild mushrooms from Portugal by gas chromatography and high performance liquid chromatography. *Microchemical Journal*, 93, 195 – 199.
- Heleno, S.A., Barros, L., Sousa, M.J., Martins, A., Ferreira, I.C.F.R. 2010. Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 119, 1443 – 1450.
- Heller, G., Adomas, A., Li, G., Osborne, J., Zyl, L., et al. 2008. Transcriptional analysis of *Pinus sylvestris* roots challenged with the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *BMC Plant Biology*, 8.

- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff F., Blackwell, M., Cannon, P.F. et al. 2007. A Higher-level phylogenetic classification of the *Fungi*. *Mycological Research*, 111, 509 – 547.
- Junghans, D.T., Gomes, E.A., Guimarães, W.V., Barros, E.G., Araújo, E.F. 1998. Genetic diversity of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* Based on RAPD-PCR analysis. *Mycorrhiza*, 7, 243 – 248.
- Kalač, P. 2009. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry*, 113, 9-16.
- Kaur I.P., Geetha T. 2006. Screening methods for antioxidants-A review. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry*, 6, 305-312
- Kellie, L.T., Hayball, P.J. 2002. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 636 – 644.
- Lamhamedi, M.S., Bernier, P.Y., Fortin, J.A. 1992. Growth, Nutrition and response to water stress of *Pinus pinaster* inoculated with ten dikaryotic strains of *Pisolithus sp.* *Tree Physiology*, 10, 153 – 167.
- López, A., García, P., Garrido, A. 2008. Multivariate characterization of table olives according to their mineral nutrient composition, *Food Chemistry*, 106, 369-378.
- Lotito, S.B., Frei, B. 2004. The increase in human plasma antioxidant capacity after apple consumption is due to the metabolic effect of fructose on urate, not apple-derived antioxidant flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 37, 251 – 258.
- Luo, Y., Li, W.M., Wang, W. 2008. Trehalose: Protector of antioxidant enzymes or reactive oxygen species scavenger under heat stress? *Environmental and Experimental Botany*, 63, 378 – 384.

- Luo, Z., Li, K., Gai, Y., Göbel, C., Wildhagen, H., et al. 2011. The ectomycorrhizal fungus (*Paxillus involutus*) modulates leaf physiology of poplar towards improved salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 72, 304 – 311.
- Maier, W., Peipp H., Schmidt, J., Wray, V., Strack, D. 1995. Levels of a terpenoid glycoside (Blumenin) and cell wall-bound phenolics in some cereal mycorrhizas. *Plant Physiology*, 109, 465-470
- Maroco, J. 2003. *Análise estatística, com utilização do SPSS*, Edições Sílabo, Lisboa, Portugal.
- 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.
- Martins, A. 2008. *In vitro* Mycorrhization of Micropropagated Plants: Studies on *Castanea sativa* Mill. In: Siddiqui Z.A., Akhtar, M.S., Futai, K. (Ed.), *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*. Springer, Netherlands.
- Mascio, P.D., Murphy, M.E., Sies, H. 1991. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 53, 194 – 200.
- Malajczuk, M., Lapeyrie, F., Garbaye, J. 1990. Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* on roots of *Eucalyptus urophylla* *in vitro*. *New Phytologist*, 114, 627 – 631.
- Miller, D.M., Buettner, G.R., Aust, S.D. 1990. Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. *Free Radical Biology & Medicine*, 8, 95 – 108.

- Mi-Yae, H.E., Tae-Hun, K., Nak-ju, S. 2003. Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of *Hymenochataceae*) extracts. Food Chemistry, 82, 593 – 597.
- Molassiotis, A.N., Sotiropoulos, T., Tanou, G., Kofidis, G., Diamantidis, G., et al. 2006. Antioxidant and anatomical responses in shoot culture of the apple rootstock MM 106 treated with NaCl, KCl, mannitol or sorbitol. Biologia Plantarum, 50, 331-338.
- Molyneux, P. 2004. The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 26, 211 – 219.
- Moore, A.E.P., Ashford, A.E., Peterson, R.L. 1991. Reserve substances in *Paxillus involutus* sclerotia. Protoplasma, 163, 67 – 81.
- Müller, T., Avolio, M., Olivi, M., Benjdia, M., Rikirsch, E., et al. 2007. Nitrogen transport in the ectomycorrhiza association: The *Hebeloma cylindrosporum*–*Pinus pinaster* model. Phytochemistry, 68, 41 – 51.
- Ng, T.B., Liu, F., Wang, Z. 2000. Antioxidative activity of natural products from plants. Life Sciences, 66, 709-723.
- Niemi, K., Vourinen, T., Ernstsén, A., Häggman. 2002. Ectomycorrhizal fungi and exogenous auxins influence root and mycorrhiza formation of Scots pine hypocotyl cuttings *in vitro*. Tree Physiology, 22, 1231 – 1239.
- Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Bento, A., Estevinho, L., et al. 2008. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. Food and Chemical Toxicology, 46, 2326 – 2331.
- Packer, L., Rimbach, G., Virgili, F. 1999. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritime*) bark, pycnogenol. Free Radical Biology & Medicine, 27, 704-724.

- Pereira, E., Barros, L., Martins, A., Ferreira, I.C.F.R. 2012. Towards chemical and nutritional inventory of Portuguese wild edible mushrooms in different habitats. *Food Chemistry*, 130, 394 – 403.
- Poole, E.J., Bending, G.D., Whipps, J.M., Read, D.J. 2001. Bacteria associated with *Pinus sylvestris* – *Lactarius rufus* ectomycorrhizas and their effects on mycorrhiza formation *in vitro*. *New Phytologist*, 151, 743 – 751.
- Read, D.J. 2002. Towards Ecological Relevance – Progress and pitfalls in the path towards an understanding of mycorrhizal functions in Nature. *Ecological Studies*, 157.
- Reis, F.S., Ferreira I.C.F.R., Barros, L., Martins, A. 2011a. A comparative study of tocopherols composition and antioxidant properties of *in vivo* and *in vitro* ectomycorrhizal fungi. *LWT – Food Science and Technology*, 44, 820 – 824.
- Reis, F.S., Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Santos-Buelga, C., Martins, A. 2011b. Mycorrhizal induction of phenolic compounds and antioxidant properties of fungi and seedlings during the early steps of symbiosis. *Chemoecology*, 21, 151 – 159.
- Reis, F.S., Ferreira, I.C.F.R., Martins, A., 2012. Effect of the mycorrhizal symbiosis time in the antioxidant activity of fungi and *Pinus pinaster* roots, stems and leaves. *Industrial Crops and Products*, 35, 211 – 216.
- Rencher, A.C. 1995. *Methods of multivariate analysis*, John Willey, New York.
- Rilling, M.C., Mummey, D.L. 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist*, 171, 41 – 53.

- Robert, L., Nancy, A., Rayssiguier, Y., Mazur, A., Rémésy, C. 2008. Lipid metabolism and antioxidant status in sucrose vs. potato-fed rats. *Journal of the American College of Nutrition*, 27, 109 – 116.
- Roginsky, V., Lissi, E.A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92, 235-254
- Sarjala, T., Niemi, K., Häggman. 2010. Mycorrhiza Formation is not needed for early growth induction and growth related changes in polyamines in Scots pine seedlings *in vitro*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 596 – 601.
- 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.
- Schelkle, M., Peterson, R.L. 1996. Suppression of common root pathogens by helper bacteria and ectomycorrhizal fungi *in vitro*. *Mycorrhiza*, 6, 481 – 485.
- Schweiger, P.F., Rouhier, H., Söderström, B. 2002. Visualisation of ectomycorrhizal rhizomorph structure using laser scanning confocal microscopy. *Mycological Research*, 106, 349 – 354.
- Silva, R.F., Antonioli, Z.I., Andreazza, R. 2003. Efeito da inoculação com fungos ectomicorrízicos na produção de mudas de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden em solo arenoso. *Ciência Florestal*, 13.
- Slankis, V. 1973. Hormonal relationships in mycorrhizal development. *ectomycorrhizae*. Academic Press, 231 – 298.
- Smith, S.E., Read, D.J. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*, 2nd Edition. Academic Press. London.

- Sousa, N.R., Franco, A.R., Ramos, M.A., Oliveira, R.S., Castro, P.M.L. 2011. Reforestation of burned stands: The effect of ectomycorrhizal fungi on *Pinus pinaster* establishment. *Soil Biology & Biochemistry*, 43, 2115 – 2120.
- Tranvan, H., Habricot, Y., Jeannette, E., Gay, G., Sotta, B. 1998. Dynamics of symbiotic establishment between an IAA-overproducing mutant of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* and *Pinus pinaster*. *Tree Physiology*, 20, 123 – 129.
- Valko, M., Liebfriz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., et al. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44 – 84.
- Webster, J., Weber, R.W.S. 2007. *Introduction to fungi*, 3rd Edition. Cambridge University Press, United Kingdom.
- Wang, X., Wang, Z., Liu, J.Z., Hu, J.X., Chen, H.L., et al. 2011. Double antioxidant activities of rosiglitazone against high glucose-induced oxidative stress in hepatocyte. *Toxicology in vitro*, 25, 839 – 847.
- Wood, J.E., Senthilmohan, S.T., Peskin, A.V. 2002. Antioxidant activity of procyanidin-containing plant extracts at different pH's. *Food Chemistry*, 77, 155 – 161.

## VI. ANEXOS

### **Anexo 1.** Publicação na revista “*Industrial Crops and Products*”.

Márcio Caroch, Isabel C.F.R. Ferreira, Lillian Barros, João C.M. Barreira, Anabela Martins. 2012. Antioxidants in *Pinus pinaster* roots and mycorrhizal fungi during the early steps of symbiosis. *Industrial Crops and Products*, 38, 99–106.

### **Anexo 2.** Comunicação em painel no XXII Encontro da Sociedade Portuguesa de Química.

M. Caroch, F.S. Reis, I.C.F.R. Ferreira, A. Martins. 2011. Propriedades antioxidantes da simbiose micorrízica de *Pinus pinaster* com *Pisolithus arhizus*. XXII Encontro Nacional da Sociedade Portuguesa de Química, Braga.

### **Anexo 3.** Comunicação em painel no VII Encontro Nacional de Cromatografia.

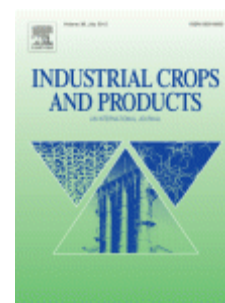
M. Caroch, L. Barros, J.C.M. Barreira, I.C.F.R. Ferreira, A. Martins. 2012. Antioxidants in *Pinus Pinaster* and mycorrhizal fungi during the early steps of symbiosis. VII Encontro Nacional de Cromatografia, Porto.





## Industrial Crops and Products

Volume 38, July 2012, Pages 99–106



# Antioxidants in *Pinus pinaster* roots and mycorrhizal fungi during the early steps of symbiosis

- Márcio Carochoa, b,
- Isabel C.F.R. Ferreira<sup>a, b</sup>, , ,
- Lillian Barros<sup>a, b</sup>,
- João C.M. Barreira<sup>a, b</sup>,
- Anabela Martins<sup>b</sup>
- <sup>a</sup> CIMO-ESA, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal
- <sup>b</sup> Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal
- Received 15 October 2011. Revised 11 January 2012. Accepted 22 January 2012. Available online 14 February 2012.
- <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.01.020>, [How to Cite or Link Using DOI](#)
- [Permissions & Reprints](#)

---

### Abstract

Ectomycorrhizal symbiosis between fungi mycelia and the roots of some plants could have important effects in the levels of antioxidants of both partners. In the present work, the effects of co-culture period in the antioxidant properties and antioxidants (phenolics, tocopherols and sugars) production during early steps of *in vitro* mycorrhization (*Pinus pinaster*–*Pisolithus arhizus* and *Pinus pinaster*–*Paxillus involutus*) were evaluated. The studied parameters were determined in each culture element (root, mycelium and medium) in order to understand the response of each partner to the symbiotic association. *P. arhizus* proved to be more compatible with *P. pinaster* than *P. involutus*, since the antioxidant activity in the latter species increased from 48 to 72 h, while *P. arhizus* antioxidant properties decreased at the same period (indicative of less oxidative stress). Despite *P. involutus* proved to be less suitable to be included in forestation programs using mycorrhization processes, it revealed a higher potential for bioactive

compounds production in the early steps of symbiosis. A maximal value of phenolics content was obtained after the first 6 h.

---

### Highlights

► *Pisolithus arhizus* was more compatible with *Pinus pinaster* than *Paxillus involutus*. ► *P. arhizus* is more suitable for forestation programs using mycorrhization processes. ► *P. involutus* revealed a higher potential for bioactive compounds production. ► A maximal value of phenolics was obtained in the early steps of symbiosis.

### Keywords

- Ectomycorrhizal fungi;
  - *Pinus pinaster*;
  - Symbiosis;
  - Co-culture period;
  - Antioxidants
- 

## 1. Introduction

Mycorrhiza absorbs mineral nutrients from soil and transports them to the root, while the plant provides photoassimilates, which are utilized by the fungus to grow and extend its mycelium to colonize the soil. Ectomycorrhizal (ECM) fungi are capable of infecting several arboreous species; thus, this symbiosis is widespread in both temperate and boreal forests and has been proposed to enhance significantly forest production. Ectomycorrhized plants survive better in adverse environmental conditions such as marginal soils, drought, pathogen attack, extreme pH and temperatures and other types of stress ([Rodríguez-Tovara et al., 2005](#)).

The basidiomycete *Pisolithus arhizus* is an almost ubiquitous ECM fungus, able to establish successful symbiosis with a wide range of plants ([Marx, 1977](#)), and it has been used as a model system for the analysis of ectomycorrhizal symbiotic interactions ([Rodríguez-Tovara et al., 2005](#)). *Paxillus involutus* is one of the most well-studied ECM fungi. The fungus is widespread in the Northern hemisphere and forms ECM with numerous coniferous and deciduous tree species ([Wallander and Söderström, 1999](#)). The unusually broad host range, relatively fast-growing mycelium, and rapid colonization of roots can explain why *P. involutus* is one of the most commonly used ECM fungi in laboratory experiments ([Hedhi et al., 2008](#)).

ECM symbiosis between the mycelia and the roots of some plants could have important effects in the levels of antioxidants of both partners: fungal mycelium and plant roots. In the early steps

of mycorrhizal associations an oxidative burst might occur through the rapid production of high amounts of ROS (reactive oxygen species) in response to external stimuli ([\[Lamb and Dixon, 1997\]](#) and [\[Baptista et al., 2007\]](#)). Therefore, the production and/or activity of antioxidants, including enzymes (*e.g.* superoxide dismutase, catalase and peroxidase; [\[Münzenberger et al., 1997\]](#) and [\[Baptista et al., 2007\]](#)) or phenolic compounds, might increase in plant roots and/or mycelia ([\[Münzenberger et al., 1995\]](#) and [\[Reis et al., 2011\]](#)).

In previous works, mechanisms of symbiosis between ECM fungi (*P. arhizus* and *P. involutus*) and a specific host plant (*P. pinaster*) were studied *in vitro* through a long term mycorrhizal induction assay (48 h, 45 days). *P. arhizus* seemed to be more compatible with *P. pinaster* than *P. involutus*, since the antioxidant activity in the latter species increased after a 48 h period, while *P. arhizus* remained unaffected ([\[Reis et al., 2011\]](#) and [\[Reis et al., 2012\]](#)). The present study aimed to evaluate the effects of co-culture period in the antioxidant properties and antioxidants (phenolics, tocopherols and sugars) production during early steps of *in vitro* mycorrhization: 0, 6 and 24 h. An additional period of 72 h was also studied in order to understand if the chemical response followed up the same trend detected in the earlier periods. Furthermore, these parameters were determined in each culture element (root, mycelium and medium) in order to understand the response of each partner to the symbiotic association.

The obtained results will be discussed in two perspectives: interest in reforestation programs ([\[Stenström et al., 1997\]](#)) taking advantage on the compatibility between fungus and host plant; or interest in production of bioactive compounds ([\[Ferreira et al., 2009\]](#)) taking advantage on different compatibilities among plant and fungus that induce a higher production of antioxidant molecules.

## 2. Materials and methods

### 2.1. *In vitro* production of mycelia and germination of *P. pinaster* seeds

Mycelia of *P. involutus* (Batsch) Fr. and *P. arhizus* (Scop.) Rauschert were isolated from sporocarps ([Fig. 1A](#) and B; collected in Bragança, Portugal) on solid Melin-Norkans medium (MMN) pH 6.6 (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> 0.0050 g/l; CaCl<sub>2</sub> 0.050 g/l; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.15 g/l; thiamine 0.10 g/l; glucose 10 g/l; casamino acids 1.00 g/l, malt 5.00 g/l and agar 20 g/l in tap water) ([\[Marx, 1969\]](#)). The strains were maintained in Petri dishes (9 cm diameter) containing the same medium at 25 °C in the dark and subcultured every 4 weeks ([Fig. 1C](#) and D). Both mycelium and culture medium were weighted separately to obtain the fresh biomass (fw).

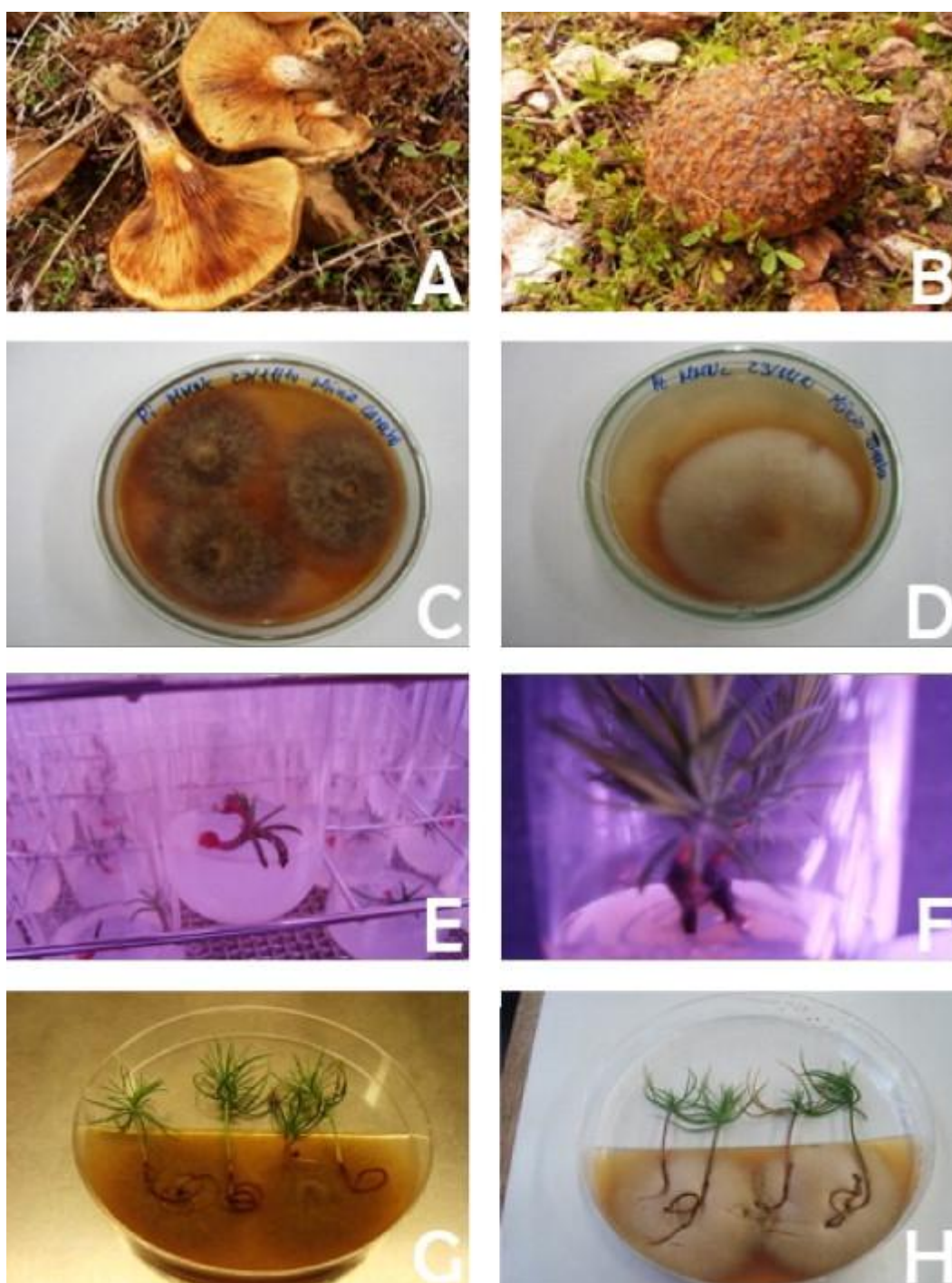


Fig. 1. (A) *Paxillus involutus* fruiting body; (B) *Pisolithus arhizus* fruiting body; (C) *Paxillus involutus* mycelium; (D) *Pisolithus arhizus* mycelium; (E) *Pinus pinaster* seeds under germination; (F) *Pinus pinaster* seedlings; (G) *Paxillus involutus* mycelium–*Pinus pinaster* seedlings mycorrhizal induction *in vitro*; (H) *Pisolithus arhizus* mycelium–*Pinus pinaster* seedlings mycorrhizal induction *in vitro*.

*P. pinaster* (Aiton) seeds (obtained in CENASEF, Centro Nacional das Sementes Florestais, Portugal) were sterilized with sodium hypochloride 5% and two drops of Tween® 80 under agitation for 15 min (Harvengt, 2005). After washes with sterilized water, the seeds were poured

in ethanol 80% for 15 min, washed again with sterilized water, and finally poured in test tubes (3 cm diameter) with agar:water 0.8%. To induce germination, the tubes were kept in the dark at 25 °C for 48 h, and then exposed to light for day and night photoperiods (16 h/8 h), respectively, in a culture chamber (Gro-Lux, Sylvania) with daylight lamps (Phillips, Amsterdam, Netherlands) (Fig. 1E and F).

## 2.2. Induction of the mycorrhizal symbiosis

Fungi mycelium was cultured in Petri dishes (12 cm diameter) with incomplete MMN (without malt and casamino acids) in slant and maintained for 20 days in the dark. Three *P. pinaster* seedlings were introduced in each Petri dish over the mycelium, and left in co-culture in the culture chamber and conditions mentioned above (Fig. 1G and H). The part of the Petri dish where the plant roots were in contact with fungi was protected from light with aluminium paper, in order to mimetize the natural conditions of mycorrhizas development. After 0, 6, 24 and 72 h of growth, mycelium and plant root were recovered from the medium. Mycelium, plant and culture medium were weighted separately to obtain the fresh biomass (fw), and then stored at -40 °C for further analyses. All the samples were lyophilised (FreeZone 4.5 model 7750031, Labconco, KS, USA) to obtain the dry biomass (dw) and further reduced to a fine dried powder (20 mesh).

## 2.3. Standards and reagents

Acetonitrile 99.9%, *n*-hexane 95%, ethyl acetate 99.8% and methanol were of HPLC grade from Fisher Scientific (Loures, Portugal). The standards sugars (D-fructose 98%, D-glucose, D-sucrose 99.0%, D-mannitol 98% and D-trehalose di-hydrate 99.5%), tocopherols ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -, and  $\gamma$ -isoforms), and trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Racemic tocol 50 mg/ml, was purchased from Matreya (PA, USA). 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) was obtained from Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA). All other chemicals and solvents were of analytical grade and purchased from common sources. Water was treated in a Milli-Q water purification system (TGI Pure Water Systems, USA).

## 2.4. Evaluation of antioxidant activity

### 2.4.1. Preparation of the extracts

Each sample (~0.4 g for mycelia and plants; 4 g for culture media) was extracted by stirring with 30 ml of methanol (25 °C at 150 rpm) for 1 h and subsequently filtered through Whatman No. 4 paper. The residue was then extracted once more under the same conditions. The combined methanolic extracts were evaporated at 40 °C (Rotary Evaporator Büchi R-210; Flawil,

Switzerland) to dryness, and redissolved in methanol. *In vitro* assays already described by the authors ([Barros et al., 2010](#)) were used to evaluate the antioxidant activity of the samples.

#### 2.4.2. DPPH radical-scavenging activity

This assay was performed in 96-well microtiter plates using an ELX800 Microplate Reader (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, USA). The reaction mixture in each of the 96-well of the plate consisted of one of the different concentrations of the extracts (30  $\mu$ l) and methanolic solution containing DPPH radicals ( $6 \times 10^{-5}$  mol/l, 270  $\mu$ l). The mixture was left to stand for 30 min in the dark. The reduction of the DPPH radical was determined by measuring the absorption at 515 nm. The radical scavenging activity (RSA) was calculated as a percentage of DPPH discoloration using the equation: % RSA =  $[(A_{\text{DPPH}} - A_s)/A_{\text{DPPH}}] \times 100$ , where  $A_s$  is the absorbance of the solution when the sample extract has been added at a particular level, and  $A_{\text{DPPH}}$  is the absorbance of the DPPH solution. The extract concentration providing 50% of radicals scavenging activity ( $EC_{50}$ ) was calculated from the graph of RSA percentage against extract concentration. Trolox was used as standard.

#### 2.4.3. Reducing power

This assay was also performed using microtiter plates and the Microplate Reader described above. Different concentrations of the extracts (0.5 ml) were mixed with sodium phosphate buffer (200 mmol/l, pH 6.6, 0.5 ml) and potassium ferricyanide (1%, w/v, 0.5 ml). The mixture was incubated at 50 °C for 20 min, and trichloroacetic acid (10%, w/v, 0.5 ml) was added. The mixture (0.8 ml) was poured into the wells of a 48-well microplate, as also deionized water (0.8 ml) and ferric chloride (0.1%, w/v, 0.16 ml), and the absorbance was measured at 690 nm. The extract concentration providing 0.5 of absorbance ( $EC_{50}$ ) was calculated from the graph of absorbance at 690 nm against extract concentration. Trolox was used as standard.

#### 2.4.4. Inhibition of $\beta$ -carotene bleaching

A solution of  $\beta$ -carotene was prepared by dissolving  $\beta$ -carotene (2 mg) in chloroform (10 ml). Two millilitres of this solution were pipetted into a round-bottom flask. The chloroform was removed at 40 °C under vacuum and linoleic acid (40 mg), Tween 80 emulsifier (400 mg), and distilled water (100 ml) were added to the flask with vigorous shaking. Aliquots (4.8 ml) of this emulsion were transferred into test tubes containing different concentrations of the extracts (0.2 ml). The tubes were shaken and incubated at 50 °C in a water bath. As soon as the emulsion was added to each tube, the zero time absorbance was measured at 470 nm (Analytikjena 200 Spectrophotometer, Jena, Germany).  $\beta$ -Carotene bleaching inhibition was calculated using the following equation: ( $\beta$ -carotene content after 2 h of assay/initial  $\beta$ -carotene content)  $\times$  100. The extract concentration providing 50% antioxidant activity ( $EC_{50}$ ) was

calculated by interpolation from the graph of  $\beta$ -carotene bleaching inhibition percentage against extract concentration. Trolox was used as standard.

#### *2.4.5. Inhibition of lipid peroxidation using thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)*

Porcine (*Sus scrofa*) brains were obtained from official slaughtering animals, dissected, and homogenized with a Polytron in ice cold Tris–HCl buffer (20 mM, pH 7.4) to produce a 1:2 (w/v) brain tissue homogenate which was centrifuged at  $3000 \times g$  for 10 min. An aliquot (0.1 ml) of the supernatant was incubated with the different concentrations of the sample solutions (0.2 ml) in the presence of  $\text{FeSO}_4$  (10 mM; 0.1 ml) and ascorbic acid (0.1 mM; 0.1 ml) at 37 °C for 1 h. The reaction was stopped by the addition of trichloro acetic acid (28%, w/v, 0.5 ml), followed by thiobarbituric acid (TBA, 2%, w/v, 0.38 ml), and the mixture was then heated at 80 °C for 20 min. After centrifugation at  $3000 \times g$  for 10 min to remove the precipitated protein, the colour intensity of the malondialdehyde (MDA)–TBA complex in the supernatant was measured by its absorbance at 532 nm. The inhibition ratio (%) was calculated using the following formula: inhibition ratio (%) =  $[(A - B)/A] \times 100\%$ , where  $A$  and  $B$  were the absorbance of the control and the sample solution, respectively.

### 2.5. Determination of antioxidant compounds

#### *2.5.1. Total phenolics*

An aliquot of the extract solution (0.5 ml) was mixed with *Folin-Ciocalteu* (FC) reagent (2.5 ml, previously diluted with water 1:10, v/v) and sodium carbonate (75 g/l, 2 ml). The tubes were vortexed for 15 s and allowed to stand for 30 min at 40 °C for colour development. Absorbance was then measured at 765 nm. Gallic acid was used to calculate the standard curve (0.0094–0.15 mg/ml), and the results were expressed as mg of gallic acid equivalents (GAEs) per g of extract.

#### *2.5.2. Tocopherols*

Tocopherols content was determined following a procedure previously optimized and described by [Barros et al. \(2008\)](#), using tocol as internal standard. The HPLC equipment consisted of an integrated system with a Smartline 1000 pump (Knauer, Berlin, Germany), a Smartline manager 5000 degasser, an AS-2057 auto-sampler (Jasco, Easton, MD) and a FP-2020 fluorescence detector (Jasco, Easton, MD) programmed for excitation at 290 nm and emission at 330 nm. Data were analysed using Clarity 2.4 Software (DataApex). The column used was a normal-phase 250 mm  $\times$  4.6 mm i.d., 5  $\mu\text{m}$ , polyamide II, with a 10 mm  $\times$  4 mm i.d. guard column of the

same material (YMC Waters, Dinslaken, Germany), operating at 30 °C. The mobile phase used was a mixture of *n*-hexane and ethyl acetate (70:30, v/v) at a flow rate of 1 ml/min. Tocopherols identification was made by comparing the relative retention times of sample peaks with standards. Quantification was based on the fluorescence signal response, using the internal standard method, and the results were expressed in mg per g of dry weight (dw).

### 2.5.3. Soluble sugars

Sugars content was determined following a procedure previously optimized and described by [Heleno et al. \(2009\)](#), using melezitose as internal standard. The HPLC system described above was connected to a Smartline 2300 refraction index (RI) detector (Knauer). Data were analysed using Clarity 2.4 Software (DataApex). The chromatographic separation was achieved with a Eurospher 100-5 NH<sub>2</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 mm, Knauer) operating at 30 °C. The mobile phase was acetonitrile/deionized water, 70:30 (v/v) at a flow rate of 1 ml/min. Sugars identification was made by comparing the relative retention times of sample peaks with standards. Quantification was made by the internal standard method and the results were expressed in g per 100 g of dry weight (dw).

## 2.6. Statistical analysis

An analysis of variance (ANOVA) with Type III sums of squares was performed using the GLM (General Linear Model) procedure of the SPSS software, version 18.0 (SPSS, Inc.). All dependent variables were analysed using a 2-way ANOVA, being the main factors the “culture element” (*P. pinaster* root, mycelium and culture medium) and the “co-culture period” (0, 6, 24 and 72 h). Since a statistical significant interaction effect (“culture element × co-culture period”) was found in all tests, the two factors were evaluated simultaneously by plotting the estimated marginal means for all levels of each factor. In addition, a linear discriminant analysis (LDA) was used as a technique to classify the three culture elements as well as the four co-culture periods according to their antioxidant activity results, and their phenolics, sugars and tocopherols contents. A stepwise technique, using the Wilks’  $\lambda$  method with the usual probabilities of  $F$  (3.84 to enter and 2.71 to remove), was applied for variable selection. This procedure uses a combination of forward selection and backward elimination procedures, where before selecting a new variable to be included, it is verified whether all variables previously selected remain significant ( [\[Rencher, 1995\]](#), [\[Maroco, 2003\]](#) and [\[López et al., 2008\]](#)). With this approach, it is possible to identify the significant variables among the antioxidant activity, and phenolics, sugars and tocopherols profiles obtained for each sample. To verify which canonical discriminant functions were significant, the Wilks’  $\lambda$  test was applied. To avoid overoptimistic data modulation, a leaving-one-out cross-validation procedure was carried out to assess the



model performance. The LDA statistical analysis and the other statistical tests were performed at a 5% significance level using the SPSS software mentioned above.

### 3. Results and discussion

In a previous work of our research group, symbiotic associations were studied after different co-culture periods, 45 days and 48 h ([Reis et al., 2012](#)), revealing different responses depending on the used fungi. *P. arhizus* seemed to be more compatible with *P. pinaster* than *P. involutus*, since the antioxidant activity in the latter species increased after a 48 h period, while *P. arhizus* remained unaffected ([Reis et al., 2011](#)) and ([Reis et al., 2012](#)). Nevertheless, the mechanisms of antioxidants production are still unknown and, therefore, the present study was conducted during early steps of *in vitro* mycorrhization: 0, 6 and 24 h. If the antioxidant activity increases in the earlier stages, this might indicate a response mechanism resulting from higher oxidative stress levels while the host plant does not recognize the fungus as a friendly species. An additional period of 72 h was also studied in order to understand if the chemical response followed up the same trend detected in the earlier periods.

The different compatibilities among plant and fungus might be used with beneficial purposes. A good compatibility between them will mean a very low oxidative stress, and therefore a low production of secondary metabolites. In this case, the fungi might be a good choice to join with the plant for reforestation programs. On the other hand, if the compatibility is low, the oxidative stress will peak at some stage, and the production of metabolites will be very high, making the association interesting to purify the antioxidants produced; in this case, it would be important to define the most suitable time to stop the co-culture in order to maximize the bioactive compound yield. Otherwise, if the fungus does not cause a significant reaction by the host, this could be interpreted as a compatibility indicator with interest in reforestation programs.

Antioxidant activity  $EC_{50}$  values and phenolic ([Table 1](#)), tocopherols ([Table 2](#)) and sugars ([Table 3](#)) contents are reported as mean value of each culture element (CE) over the different co-culture periods (CP) as well as mean value of all elements within each co-culture period. The presentation of the results in this form is more adequate to evaluate the effects of both factors (CE and CP) independently of each other, thus avoiding interaction based outcomes. The results show that the interaction CP  $\times$  CE was a significant ( $p < 0.001$ ) source of variation for all the evaluated parameters. Hence, although the least squares means are presented for the main effects, no multiple comparisons were performed. Furthermore, both main factors (CP and CE) showed a significant effect ( $p < 0.001$ ). However, from the analysis of the plots of the estimated margins means (data shown only in specific cases), for each variable, some general conclusions can be acquired.

Table 1. Antioxidant activity EC<sub>50</sub> values (mg/ml) and phenolic content (mg GAE/g extract) obtained for the culture elements (CE). The results are presented as mean ± SD<sub>a</sub> (*n* = 27, for each co-culture period (CP); *n* = 36 for each culture element).

		DPPH scavenging activity	Reducing power	β-Carotene bleaching inhibition	TBARS assay	Phenolics
<i>Pisolithus arhizus</i>						
CP	0 h	27 ± 38	8 ± 11	1 ± 1	0.1 ± 0.2	148 ± 107
	6 h	37 ± 52	10 ± 14	3 ± 4	1 ± 1	107 ± 90
	24 h	16 ± 23	5 ± 7	11 ± 15	2 ± 3	82 ± 60
	72 h	29 ± 41	35 ± 50	1.0 ± 0.5	3 ± 4	99 ± 77
	<i>p</i> -Value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
CE	Root	0.2 ± 0.1	0.13 ± 0.03	0.7 ± 0.3	0.1 ± 0.1	199 ± 42
	Mycelium	1.0 ± 0.3	0.8 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.06 ± 0.04	125 ± 38
	Medium	80 ± 22	43 ± 37	11 ± 12	4 ± 4	3 ± 1
	<i>p</i> -Value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
CP × CE	<i>p</i> -Value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
<i>Paxillus involutus</i>						
CP	0 h	3 ± 4	3 ± 4	2 ± 3	3 ± 5	146 ± 106
	6 h	5 ± 6	7 ± 10	3 ± 3	4 ± 6	154 ± 160
	24 h	3 ± 3	3 ± 4	2 ± 3	4 ± 5	126 ± 122
	72 h	3 ± 3	2 ± 3	3 ± 3	8 ± 11	95 ± 81
	<i>p</i> -Value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
CE	Root	0.6 ± 0.3	0.3 ± 0.2	0.8 ± 0.5	0.01 ± 0.01	125 ± 74
	Mycelium	0.4 ± 0.2	0.18 ± 0.05	0.4 ± 0.3	0.1 ± 0.1	261 ± 78
	Medium	9 ± 3	11 ± 5	7 ± 1	14 ± 6	6 ± 1
	<i>p</i> -Value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
CP × CE	<i>p</i> -Value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

a

Results are reported as mean value of each culture element (CE) over the different co-culture periods (CP) as well as mean value of all elements within each co-culture period.

Table 2. Tocopherols content (mg/100 g dw) in the culture elements (CE). The results are presented as mean ± SD<sub>a</sub> (*n* = 27, for each co-culture period (CP); *n* = 36 for each culture element).

		α-Tocopherol	β-Tocopherol	γ-Tocopherol	δ-Tocopherol	Total tocopherols
<i>Pisolithus arhizus</i>						
CP	0 h	1 ± 2	0.1 ± 0.1	15 ± 20	9 ± 12	25 ± 18
	6 h	1 ± 1	0.06 ± 0.04	10 ± 13	1 ± 1	11 ± 12
	24 h	1 ± 1	0.05 ± 0.03	12 ± 17	1 ± 2	14 ± 16
	72 h	9 ± 12	0.4 ± 0.5	15 ± 21	3 ± 4	27 ± 19
	<i>p</i> -Value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001
CE	Root	8 ± 10	0.3 ± 0.5	0.3 ± 0.2	10 ± 10	19 ± 15
	Mycelium	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.1	38 ± 7	0.05 ± 0.05	38 ± 7
	Medium	0.03 ± 0.04	0.06 ± 0.02	0.5 ± 0.3	0.2 ± 0.3	0.7 ± 0.5
	<i>p</i> -Value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
CP × CE	<i>p</i> -Value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
<i>Paxillus involutus</i>						
CP	0 h	1 ± 2	0.02 ± 0.03	0.5 ± 0.1	9 ± 12	11 ± 15
	6 h	1 ± 1	nd	0.6 ± 0.5	2 ± 2	3 ± 3
	24 h	1 ± 1	0.01 ± 0.01	0.9 ± 0.4	1 ± 2	3 ± 2
	72 h	1 ± 1	0.01 ± 0.01	1 ± 1	1 ± 2	3 ± 2

		$\alpha$ -Tocopherol	$\beta$ -Tocopherol	$\gamma$ -Tocopherol	$\delta$ -Tocopherol	Total tocopherols
	<i>p</i> -Value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001
CE	Root	2 ± 1	0.01 ± 0.02	0.5 ± 0.1	10 ± 10	12 ± 11
	Mycelium	0.004 ± 0.001	0.01 ± 0.01	1.3 ± 0.5	0.03 ± 0.02	1.4 ± 0.5
	Medium	nd	nd	0.3 ± 0.3	nd	0.3 ± 0.3
	<i>p</i> -Value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
CP × CE	<i>p</i> -Value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

a

Results are reported as mean value of each culture element (CE) over the different co-culture periods (CP) as well as mean value of all elements within each co-culture period.

Table 3. Sugars content (g/100 g dw) in the culture elements (CE). The results are presented as mean ± SD<sub>a</sub> ( $n = 27$ , for each co-culture period (CP);  $n = 36$  for each culture element).

		Fructose	Glucose	Mannitol	Sucrose	Trehalose	Total sugars
<i>Pisolithus arhizus</i>							
CP	0 h	1 ± 2	10 ± 8	0.3 ± 0.4	1 ± 1	2 ± 2	14 ± 6
	6 h	1 ± 2	11 ± 10	0.2 ± 0.2	1 ± 1	1 ± 2	14 ± 8
	24 h	2 ± 2	11 ± 11	0.3 ± 0.4	1 ± 1	1 ± 1	15 ± 9
	72 h	3 ± 4	11 ± 10	0.1 ± 0.2	1 ± 1	1 ± 2	16 ± 8
	<i>p</i> -Value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
CE	Root	5 ± 2	5 ± 1	0.6 ± 0.2	1.9 ± 0.3	nd	13 ± 3
	Mycelium	nd	2.7 ± 0.5	nd	nd	4 ± 1	7 ± 1
	Medium	nd	24 ± 2	nd	nd	nd	24 ± 2
	<i>p</i> -Value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
CP × CE	<i>p</i> -Value	<0.011	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
<i>Paxillus involutus</i>							
CP	0 h	1 ± 2	11 ± 11	0.5 ± 0.4	1 ± 1	0.2 ± 0.3	14 ± 10
	6 h	0.03 ± 0.05	9 ± 12	0.3 ± 0.4	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.4	10 ± 12
	24 h	0.04 ± 0.06	10 ± 13	0.3 ± 0.4	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	10 ± 13
	72 h	0.05 ± 0.07	9 ± 13	0.3 ± 0.4	0.2 ± 0.3	0.1 ± 0.1	10 ± 12
	<i>p</i> -value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
CE	Root	1 ± 1	2 ± 3	0.3 ± 0.3	1 ± 1	0.06 ± 0.04	4 ± 5
	Mycelium	nd	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.1	nd	0.5 ± 0.3	1.8 ± 0.3
	Medium	nd	27 ± 1	nd	nd	nd	27 ± 1
	<i>p</i> -Value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
CP × CE	<i>p</i> -Value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

a

Results are reported as mean value of each culture element (CE) over the different co-culture periods (CP) as well as mean value of all elements within each co-culture period.

For instance, in *P. arhizus*–*P. pinaster* co-culture, the antioxidant activity remained nearly constant in *P. pinaster* root, while *P. arhizus* mycelium showed a significant decrease (increase of EC<sub>50</sub> values) for the 72 h period, after keeping similar values in the first 24 h. Regarding culture medium, the results were analogous to those obtained for the mycelium, except for  $\beta$ -carotene bleaching assay. This outcome might indicate that after an initial physiological adaptation period, reflected by slight changes in the antioxidant activity, at 72 h the plant had already recognized the fungus as non-pathogenic. As it is only evident in plots of the estimated

margins means (data not shown) and not in [Table 1](#), it should be clarified that these differences were mainly related with the culture medium.

For *P. involutus*-*P. pinaster* co-culture, the EC<sub>50</sub> values obtained for DPPH scavenging activity and reducing power assays were lower (mainly in the culture medium) than the obtained with the other fungi ([Table 1](#)), which is in agreement with the reported by [\[Reis et al., 2011\]](#) and [\[Reis et al., 2012\]](#) and with its higher phenolic content ([Table 1](#)). Despite some similarities in the antioxidant activities obtained in each mycorrhization, there are some particular results which may define some compatibility differentiation. For instance, while the EC<sub>50</sub> values tended to increase from 24 to 72 h in *P. arhizus* (except for  $\beta$ -carotene bleaching assay), the same values were almost unaffected in *P. involutus*, for the same period (except for TBARS assay) ([Table 1](#)). Nonetheless, in both cases, the antioxidant activity is maintained close to constant in each mycelium and root, varying significantly in the culture medium. Even so, while the phenolic contents were maximal at 0 h in *P. arhizus*-*P. pinaster* co-culture (148 mg GAE/g), their highest value was obtained at 6 h for *P. involutus*-*P. pinaster* (154 mg GAE/g) ([Table 1](#)). This might indicate that the antioxidant activity is supported not only by phenolic compounds, since mycelium and root maintained their antioxidant potential despite the variation in phenolics contents. Furthermore, the increase in the antioxidant activity of the culture medium was not conveyed by a rise of the phenolics content.

Regarding tocopherols,  $\alpha$ - and  $\delta$ -tocopherol were higher in *P. pinaster* root, while  $\gamma$ -tocopherol was the prevalent vitamer in the mycelia for both co-cultures, but presenting higher values in *P. arhizus* ([Fig. 2A](#), [Table 2](#)). An interesting finding is related with the high variation along CP of  $\alpha$ - and  $\delta$ -tocopherol in the *P. arhizus*-*P. pinaster* co-culture ([Table 2](#)), while in the *P. involutus*-*P. pinaster* co-culture, only  $\delta$ -tocopherol showed a significant decrease along CP, indicating that the metabolic dynamics of vitamin E might be affected by the symbiont species. In general, total tocopherols did not vary in the culture medium for both mycorrhizations but although *P. pinaster* root was the element with higher tocopherols content in the *P. involutus*-*P. pinaster* co-culture, the mycelium was the element with higher content of this vitamin in the *P. arhizus*-*P. pinaster* co-culture ([Table 2](#)).

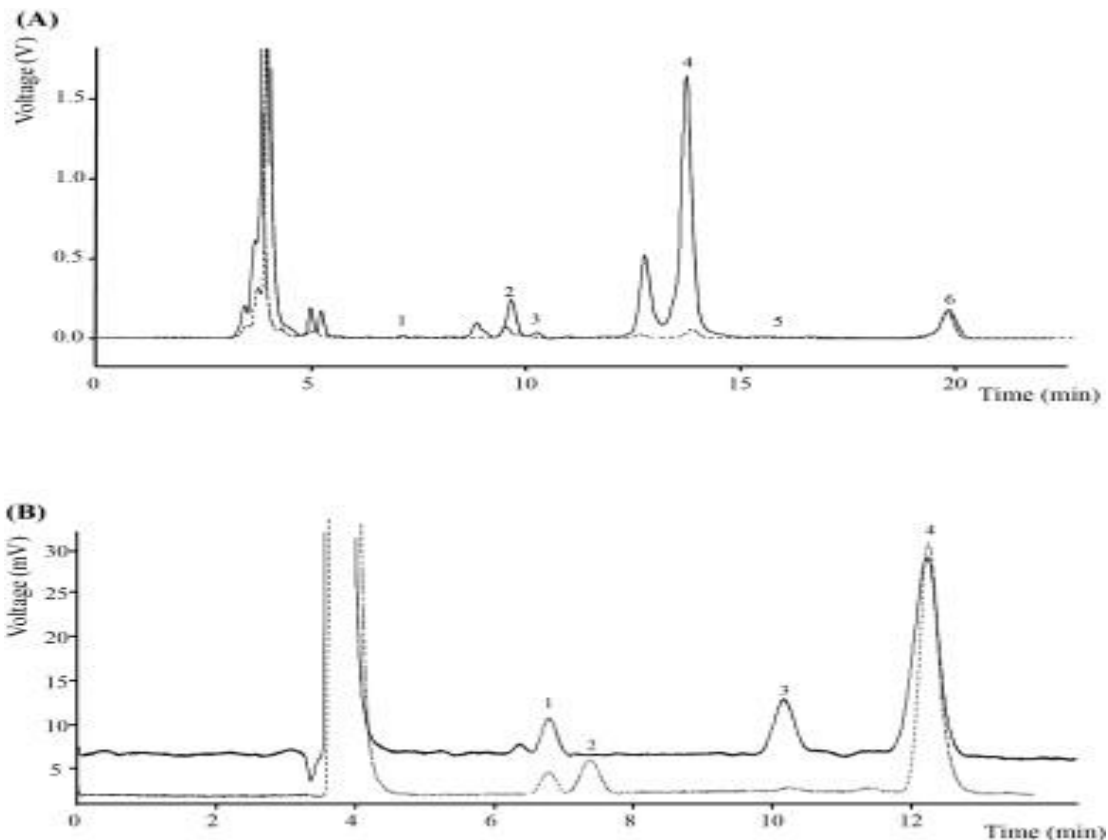


Fig. 2. (A) Tocopherols profile of *Pisolithus arhizus* (—) and *Paxillus involutus* (---) mycelium in co-culture with *Pinus pinaster* root for 24 h (1,  $\alpha$ -tocopherol; 2, BHT; 3,  $\beta$ -tocopherol; 4,  $\gamma$ -tocopherol; 5,  $\delta$ -tocopherol; 6- IS). (B) Sugars profile of *Pisolithus arhizus* (—) and *Paxillus involutus* (---) mycelium in co-culture with *Pinus pinaster* root for 72 h (1, glucose; 2, mannitol; 3, trehalose; 4, IS).

Considering sugars contents, fructose and sucrose were only detected in *P. pinaster* root in both co-cultures, despite the content in both sugars were higher in the *P. pinaster*-*P. arhizus* co-culture (Table 3). However, while fructose increased and sucrose was maintained constant in the *P. arhizus*-*P. pinaster* co-culture along CP, both sugars decreased in the *P. involutus*-*P. pinaster* co-culture. Mannitol was only found in *P. involutus* mycelium while trehalose was found in both mycelia (Fig. 2B; Table 3). In the *P. involutus*-*P. pinaster* co-culture, mannitol tended to decrease in the mycelium and to remain unaffected in the root, while trehalose augmented in the root and lowered in the mycelium. Glucose showed an interesting behaviour along time, since their variation denoted an apparent complementarity among *P. pinaster* root and *P. arhizus* mycelium, a tendency that was also reflected in the total sugars content (Fig. 3A); in the *P. pinaster*-*P. involutus* co-culture, glucose varied only in the root, in which tended to decrease. The *P. pinaster*-*P. arhizus* co-culture elements presented higher sugars values, mainly based on the results obtained for fructose and trehalose (Table 3).

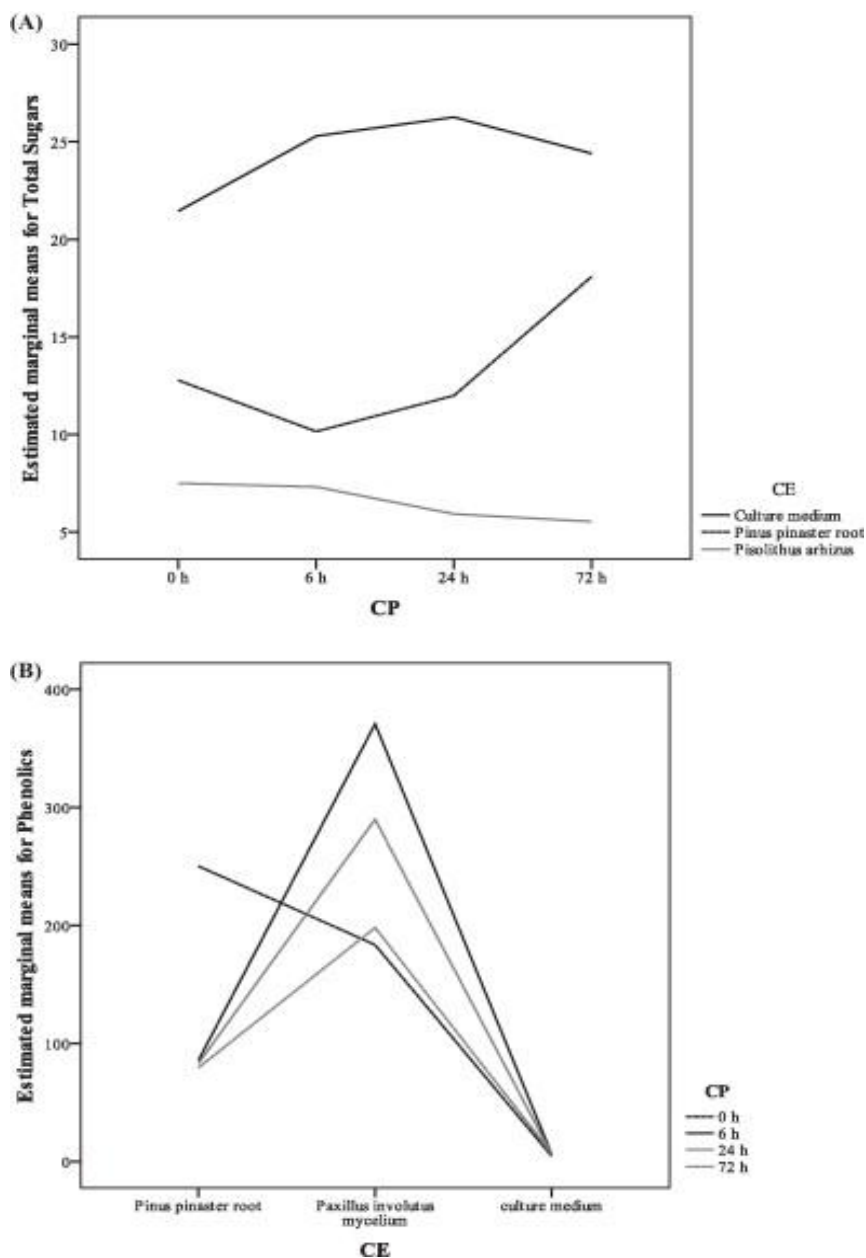


Fig. 3. Estimated marginal means for total sugars contents (A) on different co-culture elements (CE) and for phenolic contents (B) on different co-culture periods (CP).

In general, there was a dual constancy among the assayed parameters. The antioxidant activity remained quite similar in *P. pinaster* root and in each one of the mycelia used in both co-cultures, while tocopherols (except  $\gamma$ -tocopherol) contents showed high similarities among culture medium and mycelia. This tendency could not be observed regarding sugars contents, an observation that might indicate that the differences in the chemical responses that characterize each mycorrhization might be related more directly with sugar (primary metabolites) exchanges.

In order to better understand the time induced differences, as well as the differences among each one of the co-culture elements, a linear discriminant analysis (LDA) was applied. The

differences induced by the co-culture period for the mycorrhization with *P. pinaster* are well observed in this analysis, in which four clusters (corresponding to the four assayed periods) were clearly individualized ([Fig. 4A](#)). In this case, all the assayed parameters (antioxidant activity assays EC<sub>50</sub> values, phenolics, tocopherols and sugars contents) were used, resulting in a discriminant model with three significant ( $p < 0.001$  for the Wilks'  $\lambda$  test) discriminant functions. These three functions explained 100.0% of the variance of the experimental data (the first explained 93.8%, the second 4.3% and the third 1.9%) ([Fig. 4A](#)). The model showed a very satisfactory classification performance allowing to correctly classifying 100.0% of the samples for the original groups and 99.1% for the cross-validation procedure.

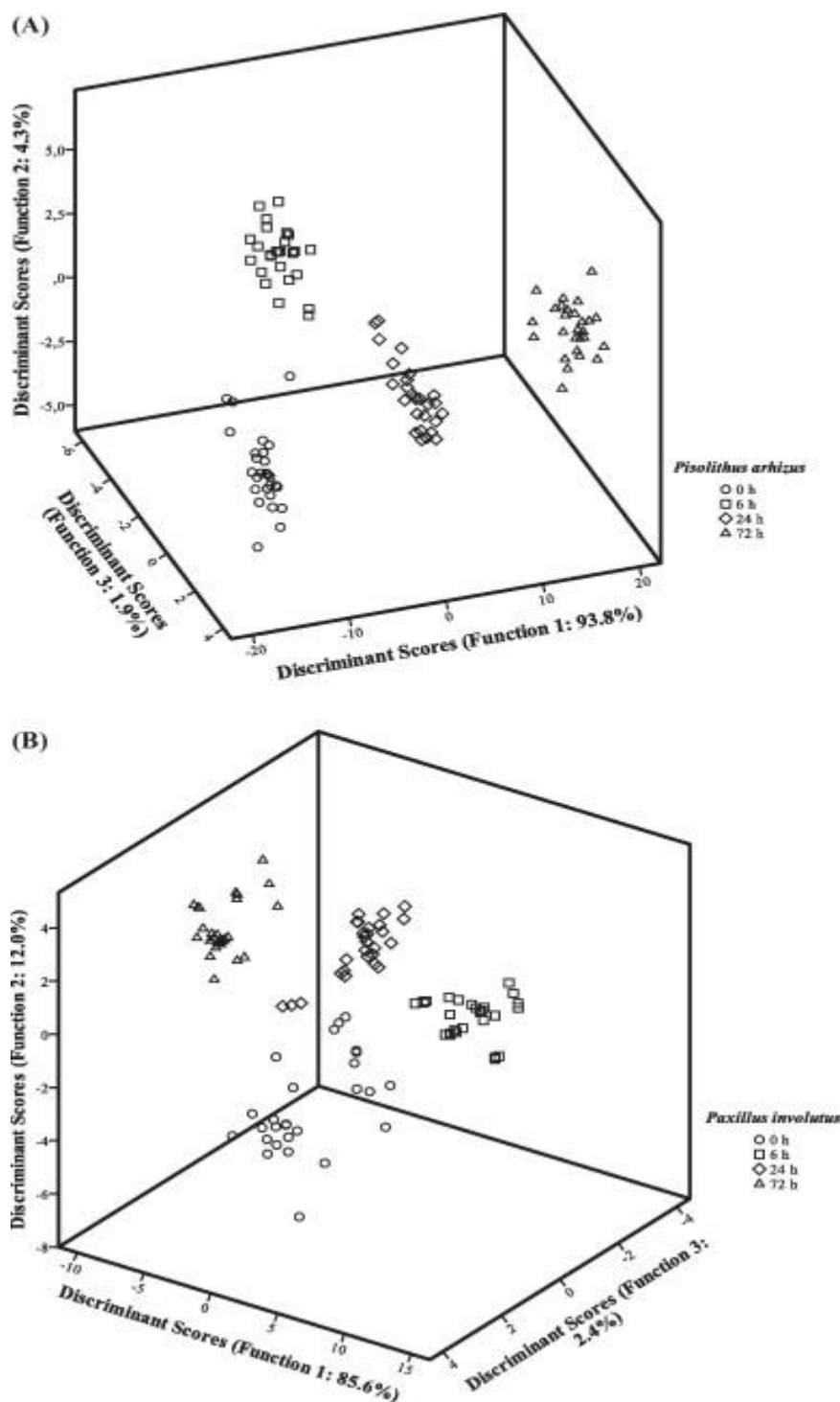


Fig. 4. Canonical analysis of co-culture (A: *Pisolithus arhizus*; B: *Paxillus involutus*) periods based on all the assayed parameters.

A similar result was also obtained for *P. involutus*–*P. pinaster* co-culture. The applied LDA also allowed the formation of four individual clusters, after the definition of three significant ( $p < 0.001$  for the Wilks'  $\lambda$  test) discriminant functions, which explained 100.0% of the variance of the experimental data (the first explained 85.6%, the second 12% and the third 2.4%) (Fig. 4B). The



model showed a very satisfactory classification performance allowing to correctly classifying 98.1% of the samples for the original groups and 96.3% for the cross-validation procedure. Regarding the co-culture elements, there seemed to be an apparent similarity along time, especially in the antioxidant properties, in both assayed co-cultures, indicating that the symbiosis did not affect the antioxidant properties of the studied species. However, the LDA results indicated that the slight differences found amongst those two elements are sufficient to discriminate them in two separate groups, either for *P. arhizus* (Fig. 5A), as for *P. involutus*. In both cases, the LDA defined two significant ( $p < 0.001$  for the Wilks'  $\lambda$  test) functions which explained 100.0% of the variance of the experimental data. The model showed a very satisfactory classification performance allowing to correctly classifying 90.7% of the samples for the original groups as well as of the cross-validation procedure for *P. involutus*. A similar result was obtained when the analysis was performed using tocopherols (91.7% of the samples for the original groups as well as of the cross-validation procedure were correctly classified) and sugars (Fig. 5B) (100.0% of the samples for the original groups as well as of the cross-validation procedure were correctly classified). For *P. arhizus* 100.0% of the samples for the original groups as well as of the cross-validation procedure were correctly classified using antioxidant activity EC<sub>50</sub> values, tocopherols or sugars.

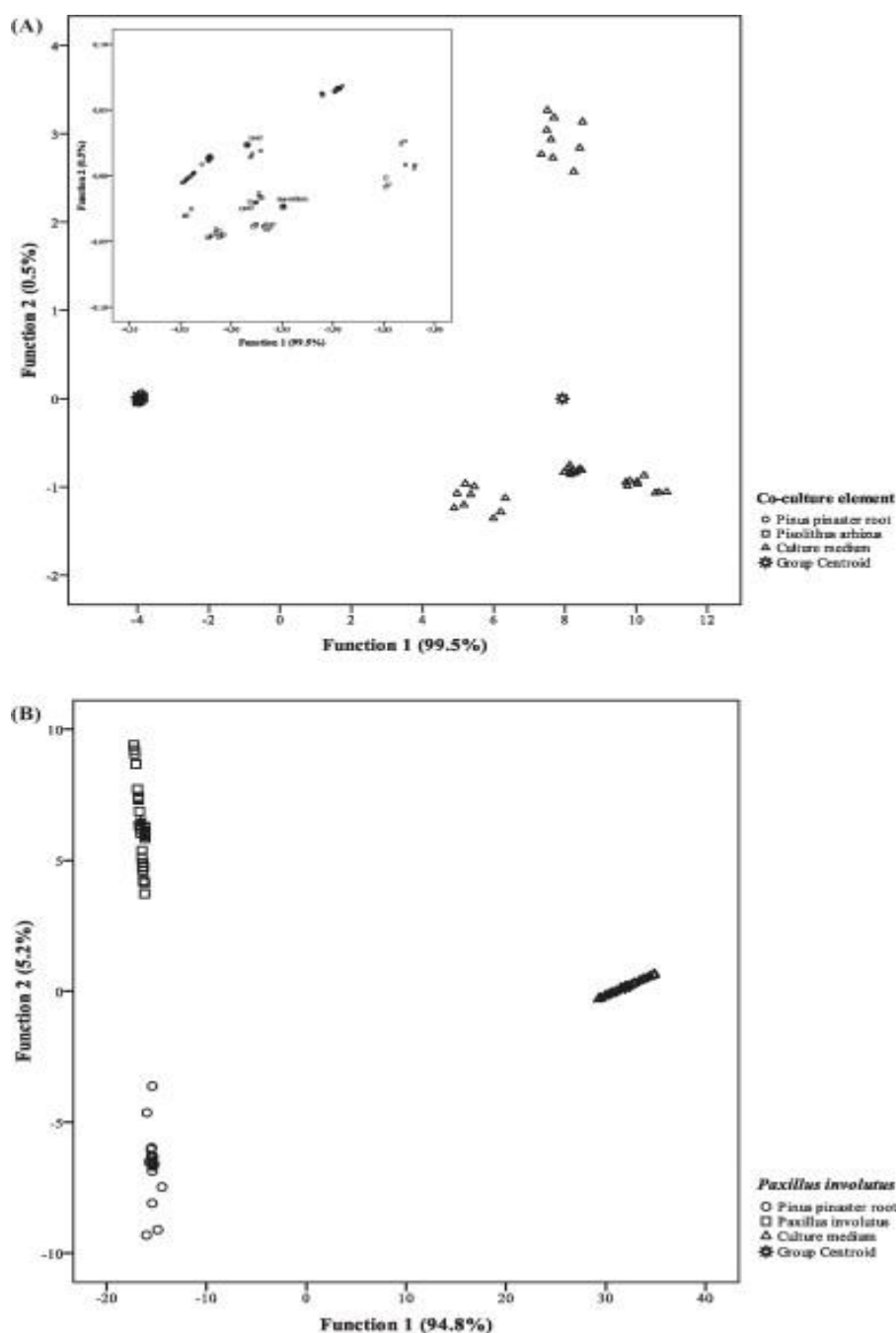


Fig. 5. Canonical analysis of *Pisolithus arhizus*–*Pinus pinaster* co-culture elements based on antioxidant activity assays  $EC_{50}$  values (A) and of *Paxillus involutus*–*Pinus pinaster* co-culture elements based on sugars contents (B). Due to the proximity of *P. pinaster* root and *P. arhizus* mycelium, an expansion in an adequate scale was included.


Overall, this study demonstrated the hypothesis suggested by [Reis et al., 2011] and [Reis et al., 2012] which stated *P. arhizus* as more compatible with *P. pinaster* than *P. involutus*, since the antioxidant activity in the latter species increased from 48 to 72 h, while *P. arhizus* antioxidant properties decreased at the same period (indicative of less oxidative stress). Despite *P. involutus* proved to be less suitable to be included in forestation programs using mycorrhization processes, it revealed a higher potential of bioactive compounds production in


the early steps of symbiosis. In fact, a maximal value of phenolics content was obtained after the first 6 h (Fig. 3B) and, therefore, considering bioactive compounds production purposes, the co-culture should be stopped at that time.



### *Acknowledgements*

The authors are grateful to Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal) and COMPETE/QREN/EU for financial support to this work (research project PTDC/AGR-ALI/110062/2009) and to CIMO (strategic project PEst-OE/AGR/UI0690/2011). L. Barros and J.C.M. Barreira thank to FCT, POPH-QREN and FSE for their grants ([SFRH/BPD/4609/2008](#) and [SFRH/BPD/72802/2010](#), respectively).


### *References*

1.
  - [Baptista et al., 2007](#)
  - P. Baptista, A. Martins, M.S. Pais, R.M. Tavares, T. Lino-Neto
  - **Involvement of reactive oxygen species during early stages of ectomycorrhiza establishment between *Castanea sativa* and *Pisolithus tinctorius***
  - Mycorrhiza, 17 (2007), pp. 185–193
  - [View Record in Scopus](#)  
|  
[Full Text via CrossRef](#)  
| Cited By in Scopus (14)
2.
  - [Barros et al., 2008](#)
  - L. Barros, D.M. Correia, I.C.F.R. Ferreira, P. Baptista, C. Santos-Buelga
  - **Optimization of the determination of tocopherols in *Agaricus* sp. edible mushrooms by a normal phase liquid chromatographic method**
  - Food Chem., 4 (2008), pp. 1046–1050
  - [Article](#) |  [PDF \(184 K\)](#) |  
[View Record in Scopus](#)  
|  
[Full Text via CrossRef](#)  
| Cited By in Scopus (11)
3.
  - [Barros et al., 2010](#)
  - L. Barros, S. Oliveira, A.M. Carvalho, I.C.F.R. Ferreira

- **In vitro antioxidant properties and characterization in nutrients and phytochemicals of six medicinal plants from the Portuguese folk medicine**
- Ind. Crops Prod., 32 (2010), pp. 572–579
- [Article](#) |  [PDF \(193 K\)](#) |  
[View Record in Scopus](#)  
|  
[Full Text via CrossRef](#)  
| [Cited By in Scopus \(3\)](#)
- 4.
  - [Ferreira et al., 2009](#)
  - I.C.F.R. Ferreira, L. Barros, R.M.V. Abreu
  - **Antioxidants in wild mushrooms**
  - Curr. Med. Chem., 16 (2009), pp. 1543–1560
  - [View Record in Scopus](#)  
|  
[Full Text via CrossRef](#)  
| [Cited By in Scopus \(36\)](#)
- 5.
  - [Harvengt, 2005](#)
  - L. Harvengt
  - **Somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait)**
  - Forest. Sci., 77 (2005), pp. 107–119
  - [View Record in Scopus](#)  
|  
[Full Text via CrossRef](#)  
| [Cited By in Scopus \(1\)](#)
- 6.
  - [Hedhi et al., 2008](#)
  - J. Hedhi, P. Samson, S. Erland, A. Tunlid
  - **Multiple gene genealogies and species recognition in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus***
  - Mycol. Res., 112 (2008), pp. 965–975
  -
- 7.
  - [Heleno et al., 2009](#)
  - S.A. Heleno, L. Barros, M.J. Sousa, A. Martins, I.C.F.R. Ferreira

- **Study and characterization of selected nutrients in wild mushrooms from Portugal by gas chromatography and high performance liquid chromatography**
- Microchem. J., 93 (2009), pp. 195–199
- [Article](#) |  [PDF \(162 K\)](#) |  
[View Record in Scopus](#)  
| [Cited By in Scopus \(12\)](#)
- 8.
  - [Lamb and Dixon, 1997](#)
  - C. Lamb, R.A. Dixon
  - **The oxidative burst in plant disease resistance**
  - Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48 (1997), pp. 251–275
  - [View Record in Scopus](#)  
|  
[Full Text via CrossRef](#)  
| [Cited By in Scopus \(1328\)](#)
- 9.
  - [López et al., 2008](#)
  - A. López, P. García, A. Garrido
  - **Multivariate characterization of table olives according to their mineral nutrient composition**
  - Food Chem., 106 (2008), pp. 369–378
  - [Article](#) |  [PDF \(225 K\)](#) |  
[View Record in Scopus](#)  
| [Cited By in Scopus \(20\)](#)
- 10.
  - [Maroco, 2003](#)
  - J. Maroco
  - **Análise Estatística, com Utilização do SPSS**
  - Edições Sílabo, Lisboa, Portugal (2003)
  -
- 11.
  - [Marx, 1969](#)
  - D.H. Marx
  - **The influence of ectotrophic fungi on the resistance of pine root to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria**

- Phytopathology, 59 (1969), pp. 153–163
- 
- 12.
  - [Marx, 1977](#)
  - D.H. Marx
  - **Tree host range and world distribution of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius***
  - Can. J. Microbiol., 23 (1977), pp. 217–223
  - [View Record in Scopus](#)
    - |
    - [Full Text via CrossRef](#)
    - | [Cited By in Scopus \(54\)](#)
- 13.
  - [Münzenberger et al., 1995](#)
  - B. Münzenberger, I. Kottke, F. Oberwinkler
  - **Reduction of phenolics in mycorrhizas of *Larix decidua* Mill.**
  - Tree Physiol., 15 (1995), pp. 191–196
  - [View Record in Scopus](#)
    - |
    - | [Cited By in Scopus \(22\)](#)
- 14.
  - [Münzenberger et al., 1997](#)
  - B. Münzenberger, T. Otter, D. Wüstrich, A. Polle
  - **Peroxidase and laccase activities in mycorrhizal and non-mycorrhizal fine roots of Norway spruce (*Picea abies*) and larch (*Larix decidua*)**
  - Can. J. Bot., 78 (1997), pp. 932–938
  - [View Record in Scopus](#)
    - |
    - [Full Text via CrossRef](#)
    - | [Cited By in Scopus \(23\)](#)
- 15.
  - [Reis et al., 2011](#)
  - F.S. Reis, I.C.F.R. Ferreira, L. Barros, C. Santos-Buelga, A. Martins
  - **Mycorrhizal induction of phenolic compounds and antioxidant properties of fungi and seedlings during the early steps of symbiosis**
  - Chemoecology, 21 (2011), pp. 151–159
  - [View Record in Scopus](#)
    - |

- [Full Text via CrossRef](#)  
[| Cited By in Scopus \(2\)](#)
- 16.
- [Reis et al., 2012](#)
  - F.S. Reis, I.C.F.R. Ferreira, A. Martins
  - **Effect of the mycorrhizal symbiosis time in the antioxidant activity of fungi and *Pinus pinaster* roots stems and leaves**
  - Ind. Crops Prod., 35 (2012), pp. 211–216
  - [Article](#) |  [PDF \(640 K\)](#) |  
[View Record in Scopus](#)  
|  
[Full Text via CrossRef](#)  
[| Cited By in Scopus \(1\)](#)
- 17.
- [Rencher, 1995](#)
  - A.C. Rencher
  - **Methods of Multivariate Analysis**
  - John Willey, New York (1995)
  -
- 18.
- [Rodríguez-Tovara et al., 2005](#)
  - A.V. Rodríguez-Tovara, R. Ruiz-Medrano, A. Herrera-Martínez, B.E. Barrera-Figueroa, M.E. Hidalgo-Lara, B.E. Reyes-Márquez, J.L. Cabrera-Ponce, M. Valdés, B. Xoconostle-Cázares
  - **Stable genetic transformation of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius***
  - J. Microbiol. Method, 63 (2005), pp. 45–54
  -
- 19.
- [Stenström et al., 1997](#)
  - E. Stenström, E. Damm, T. Unestam
  - **Le rôle des mycorrhizes dans la protection des arbres forestiers contre les agents pathogènes du sol**
  - Rev. For Fr., XLIX - n° sp. (1997), pp. 121–128
  -
- 20.
- [Wallander and Söderström, 1999](#)

- H. Wallander, B. Söderström
- ***Paxillus***
- J.W.G. Cairney, S.M. Chambers (Eds.), *Ectomycorrhizal Fungi: Key Genera in Profile*, Springer-Verlag, Berlin (1999), pp. 231–252
- [View Record in Scopus](#)  
| [Cited By in Scopus \(10\)](#)



Corresponding author at: CIMO-ESA, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal. Tel.: +351 273 303219; fax: +351 273 325405.

Copyright © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.



## Propriedades antioxidantes da simbiose micorrízica de *Pinus pinaster* com *Pisolithus arhizus*

Márcio Carochó<sup>a,b</sup>, Filipa S. Reis<sup>a,b</sup>, Isabel C.F.R. Ferreira<sup>a,b</sup>, Anabela Martins<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Centro de Investigação de Montanha, Campus de Santa Apolónia, apartado 1172, 5301-854 Bragança

<sup>b</sup>Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, apartado 1172, 5301-854 Bragança  
mcarochó@gmail.com

A simbiose ectomicorrízica (ECM) desenvolvida entre as raízes das plantas hospedeiras e os fungos ectomicorrízicos presentes no solo é um importante factor que contribui para a sobrevivência, sanidade e crescimento destas, assim como estimula a sua absorção de água e nutrientes [1]. Esta associação implica um processo de reconhecimento envolvendo sinais químicos e, provavelmente, uma activação dos mecanismos de resposta ao stress oxidativo, havendo uma alteração na produção de compostos, nomeadamente antioxidantes [2]. Neste trabalho, analisaram-se as propriedades e os compostos antioxidantes ao longo do processo de micorrização entre *Pisolithus arhizus* e *Pinus pinaster*, nomeadamente ao fim de 6h, 24h e 72h de contacto entre a raiz e o fungo, de forma a avaliar os efeitos do processo simbiótico. As propriedades antioxidantes foram estudadas em termos de actividade captadora de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), poder redutor, inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno e inibição da peroxidação lipídica pelo ensaio das espécies reactivas do ácido tiobarbitúrico (TBARS). Foi ainda determinada a concentração em fenóis totais pelo método de *Folin Ciocalteu*. A associação micorrízica revelou ter efeitos na actividade antioxidante das raízes enquanto ao nível do fungo não se verificam diferenças significativas na actividade antioxidante e no teor em fenóis totais, nos diferentes tempos testados. Na planta, verificou-se um decréscimo na composição em fenóis até às 24h de associação, aumentando posteriormente até às 72h de contacto, não igualando contudo os valores iniciais (250 mg EAG/g extracto). As propriedades antioxidantes deste simbiote seguiram, genericamente, a mesma tendência. Os meios de cultura revelaram os valores mais baixos em fenóis totais e actividade antioxidante demonstrando, no entanto, que poderá haver alguma libertação de compostos com estas propriedades para o meio. Pode ainda concluir-se que as raízes de *Pinus pinaster* evidenciaram maior actividade antioxidante (valores de  $EC_{50} \leq 1,15$  mg/ml) e maior concentração de fenóis (141-251 mg EAG/g extracto) do que *Pisolithus arhizus* (valores de  $EC_{50} \leq 1,40$  mg/ml; fenóis 99-108 mg EAG/g extracto), nos mesmos tempos de contacto.

**Agradecimentos:** Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) e COMPETE/QREN/UE pelo apoio financeiro através do projecto PTDC/AGR-ALI/110062/2009.

### Referências

- [1] Heller, G., Adomas, A., Li, G., Osborne, J., Zyl, L., Sederoff, R., Finlay, R.D., Stenlid, J., Asiegbu, F.O. *BMC Plant Biology*, 8 (2008) 19.  
[2] Reis FS, Ferreira ICFR, Barros L, Martins A. *LWT – Food Science and Technology* 44, (2011) 820 – 824.

## Antioxidants in *Pinus Pinaster* and mycorrhizal fungi during the early steps of symbiosis

Márcio Carochó, Lillian Barros, João C.M. Barreira, Isabel C.F.R. Ferreira\* and Anabela Martins

CIMO/ESA, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Sta Apolónia, Ap. 1172, 5301-855 Bragança, Portugal.

\* iferreira@ipb.pt .

Ectomycorrhizal symbiosis between fungi and the roots of some plants could have important effects in the levels of antioxidants of both partners [1,2]. In the present work, the effects of co-culture period (6, 24 and 72 h) in the antioxidant properties and antioxidants production during early steps of in vitro mycorrhization (*Pinus pinaster* - *Pisolithus arhizus* and *Pinus pinaster* - *Paxillus involutus*) were evaluated. The studied parameters were determined in each culture element (root, mycelium and medium) in order to understand the response of each partner to the symbiotic association. The antioxidant properties were determined by assays evaluating free radicals scavenging activity, reducing power,  $\beta$ -carotene bleaching inhibition and lipid peroxidation inhibition in animal brain homogenates. The concentrations in phenolics, tocopherols and sugars were obtained by *Folin Ciocalteu* assay, HPLC-fluorescence and HPLC-RI, respectively. *P. arhizus* proved to be more compatible with *P. pinaster* than *P. involutus*, since the antioxidant activity in the latter species increased from 48 to 72 h, while *P. arhizus* antioxidant properties decreased at the same period (less oxidative stress). Despite *P. involutus* proved to be less suitable to be included in reforestation programs using mycorrhization processes, it revealed a higher potential for bioactive compounds production in the early steps of symbiosis. A maximal phenolics content was obtained after the first 6 h and, considering bioactive compounds production purposes, the co-culture should be stopped at that time. Tocopherols (except  $\gamma$ -tocopherol) contents showed high similarities among culture medium and mycelia. This tendency could not be observed regarding sugars contents, which might indicate that the differences in the chemical responses that characterize each mycorrhization might be related more directly with sugar (primary metabolites) exchanges.

*Acknowledgments.* FCT and COMPETE/QREN/EU for research project PTDC/AGR-ALI/110062/2009; POPH-QREN and FSE for BPD/4609/2008 and BPD/72802/2010 grants to L. Barros and J.C.M. Barreira, respectively.

[1] Reis FS, Ferreira ICFR, Barros L, Santos-Buelga C, Martins A, *Chemoecology*, 2011, 21, 151-159.

[2] Reis FS, Ferreira ICFR, Martins A, *Ind. Crops Prod.* 2012, 35, 211-216..