



Universidade de Aveiro Departamento de Química  
2018

**Daniel Filipe Fonseca  
Abreu Miranda**

**Cultivo de fungos comestíveis: estudos com  
espécies saprófitas e ectomicorrízicas**





Universidade de Aveiro Departamento de Química  
2018

**Daniel Filipe Fonseca  
Abreu Miranda**

**Cultivo de fungos comestíveis: estudos com  
espécies saprófitas e ectomicorrízicas**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida, Professora Auxiliar c/ Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e da Professora Doutora Maria Teresa Silva Gonçalves Serra e Silva, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra



## **o júri**

presidente

**Professor Doutor João Filipe da Luz Mano**  
professor catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

arguente

**Professor Doutor António Manuel Santos Carriço Portugal**  
professor auxiliar do Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

orientadora

**Professora Doutora Maria Teresa Silva Gonçalves Serra e Silva**  
professora auxiliar do Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra



## **agradecimentos**

Agradeço à Professora Doutora Adelaide Almeida, orientadora na Universidade de Aveiro, por ter aceite este projecto.

Agradeço de forma especial à Professora Doutora Teresa Gonçalves, orientadora na Universidade de Coimbra, por todo o apoio e dedicação ao longo do ano de trabalho que culminou com a execução desta dissertação.





## palavras-chave

Ectomicorrizas, cogumelos comestíveis, *Eucaliptus globulus*, *Hydnum repandum*, corpo frutífero, *Macrolepiota procera*, cultivo

## resumo

Os fungos comestíveis são apreciados um pouco por todo o mundo devido ao seu elevado sabor e valor nutricional. Estes podem ser colhidos na natureza, estando sujeitos à sazonalidade, ou produzidos em condições controladas, estando assim disponíveis durante todo o ano. A produção da espécie saprófita *Macrolepiota procera* e das espécies ectomicorrízicas *Boletus edulis*, *B. fragrans*, *Hydnum repandum*, *Tricholoma equestre* e *T. portentosum* são de particular interesse não só devido ao seu potencial gastronómico, mas também como importante fonte de rendimento económico. Além disso, é de todo relevante a exploração de grandes áreas florestais dominadas por *Eucaliptus globulus*, espécie exótica em Portugal, com vista à produção de cogumelos e consequente maximização do seu rendimento.

O principal objetivo desta dissertação é o estudo da produção de cogumelos comestíveis, incluindo espécies ectomicorrízicas e saprófitas. Desta forma, estudou-se e reportou-se pela primeira vez a associação ectomicorrízica de grande potencial económico entre *H. repandum* e *E. globulus*, em condições naturais; realizaram-se ensaios *in vitro* tendo em vista a exploração dos potenciais simbiotes ectomícorrizicos comestíveis de *E. globulus*; e otimizaram-se as condições de cultura de *M. procera* visando alcançar-se a produção de corpos frutíferos.

Foram analisadas amostras de solo colhido 5 cm abaixo do corpo frutífero de *H. repandum* em plantações de *E. globulus*. As micorrizas encontradas foram separadas, classificadas em grupos morfológicos e identificadas molecularmente através da amplificação e sequenciação da região ITS (Internal Transcribed Spacer) confirmando-se assim a presença de *H. repandum* associado às raízes de *E. globulus*. As micorrizas de *H. repandum* foram caracterizadas morfológica e anatomicamente através da análise de ectomicorrizas frescas à lupa, assim como de cortes resultantes de impregnações em parafina e em resina ao microscópio. As micorrizas observadas apresentavam um sistema de ramificação monopodial-piramidal, com as extremidades não ramificadas dobradas, cor laranja esbranquiçadas e pontas brancas. Anatomicamente apresentavam uma rede de Hartig cortical, como é característico desta espécie fúngica com outros parceiros vegetais.

Para os ensaios *in vitro* com *E. globulus* foram testados quatro protocolos de esterilização e de germinação de sementes. Como potenciais simbiotes ectomicorrízicos utilizaram-se os fungos comestíveis - *Boletus edulis*, *B. fragrans*, *H. repandum*, *Lactarius deliciosus*, *Tricholoma equestre* e *T. portentosum* - e, como controlo positivo, *Pisolithus tinctorius*. As culturas de

micélio foram colocadas a crescer em caixas de Petri com meio Potato Dextrose Agar (PDA) e para o aumento de escala foram utilizados balões de Erlenmeyer de 50 mL, com 30 mL de meio líquido Biotin-Aneurin-Folic Acid (BAF). Foram otimizadas através do uso de diversos substratos (composição e percentagens) as condições de crescimento de *E. globulus*. Para a síntese das ectomicorrizas foram testados três métodos de inoculação distintos – inóculo líquido, inóculo esporal e *soil traps*. Ao longo de todo este ensaio foram efetuados três momentos de avaliação às partes aérea e radicular das plantas. Os ensaios de síntese *in vitro* de micorrizas de *E. globulus* com diversas espécies de fungos comestíveis e através de métodos de inoculação distintos, não tiveram sucesso. Apesar disso, foi aperfeiçoada uma metodologia de micorrização em condições controladas através da seleção do melhor protocolo de esterilização e germinação de sementes, tal como da melhor composição e percentagens de substratos para o crescimento de *E. globulus*.

Para a otimização da produção de *spawn* de *M. procera* foram ensaiadas três misturas de substratos de aveia e trigo - 100 % aveia, 100 % trigo e 70 % aveia + 30 % trigo. Foram utilizados dois tipos de contentores distintos para o embalamento de três substratos de produção de cogumelos - folhas de carvalho + estrume de cavalo, palha de trigo + estrume de cavalo e palha de arroz + estrume de cavalo - todos com pesos iguais (1:1). Na tentativa de induzir a formação de corpos frutíferos foram aplicados diversos estímulos, como a aplicação inicial de cinco receitas de terra de cobertura seguido de dois tratamentos distintos - com e sem refrigeração - entre outros. O crescimento da *spawn* na mistura 70 % aveia + 30 % trigo revelou ser ideal para um desenvolvimento rápido e saudável do micélio de *M. procera*. Embora com pequenas variações, todos os substratos de produção de cogumelos foram altamente colonizados pelo fungo. Não se formaram cogumelos após a aplicação dos diversos estímulos de indução da formação de corpos frutíferos. No entanto, nos substratos cuja terra de cobertura era à base de manta morta que não sofreram estímulo de refrigeração, obtiveram-se pequenas massas densas de hifas, semelhantes às estruturas que originam os corpos frutíferos na natureza.

Este trabalho veio acrescentar novos conhecimentos de extrema importância para o desenvolvimento de novos protocolos de produção de cogumelos comestíveis assim como para a exploração de novas associações micorrízicas de grande interesse económico e biotecnológico.

## keywords

Ectomycorrhizas, edible mushrooms, *Eucalyptus globulus*, *Hydnum repandum*, fruiting bodies, *Macrolepiota procera*, cultivation

## abstract

Edible fungi are appreciated all over the world due to their high taste and nutritional value. These fungi may be harvested in nature, being subject (subjected) to seasonality, or produced under controlled conditions, being available throughout the year. The production of saprophyte species *Macrolepiota procera* and the ectomycorrhizal species *Boletus edulis*, *B. fragrans*, *Hydnum repandum*, *Tricholoma equestre* and *T. portentosum* are of particular interest not only because of their gastronomic potential but also as an important source of economic yield. In addition, the exploration of large forest areas dominated by *Eucalyptus globulus*, an exotic species in Portugal, in order to produce mushrooms and consequent maximization of their yield is of great relevance.

The main objective of this dissertation is the study of the production of edible mushrooms, including ectomycorrhizal and saprophytic species. In this way, the ectomycorrhizal association of great economic potential between *H. repandum* and *E. globulus* was studied and reported for the first time under natural conditions; *In vitro* assays were carried out in order to explore the potential edible ectomycorrhizal symbionts of *E. globulus*; and *M. procera* culture conditions were optimized in order to reach the production of fruiting bodies.

Soil samples harvested 5 cm below the fruiting bodies of *H. repandum* in *E. globulus* plantations were analyzed. The mycorrhizae were separated, classified into morphological groups and molecularly identified through the amplification and sequencing of the ITS (Internal Transcribed Spacer) region, thus confirming the presence of *H. repandum* associated with *E. globulus* roots. The mycorrhizae of *H. repandum* were characterized morphologically and anatomically through the analysis of fresh ectomycorrhizae with the stereo microscope as well as cuts resulting from impregnations in paraffin and resin under a microscope. The observed mycorrhizae showed a monopodial-pyramidal ramification system, with the unramified ends bent, whitish orange color and white tips. Anatomically, they presented a cortical Hartig network, as generally observed in the relation of this fungal species with other plant partners.

Four protocols for sterilization and seed germination were tested for *in vitro* tests with *E. globulus*. As potential ectomycorrhizal symbionts were used the edible fungi species - *Boletus edulis*, *B. fragrans*, *H. repandum*, *Lactarius deliciosus*, *Tricholoma equestre* and *T. portentosum* - and as a positive control, *Pisolithus tinctorius*. Mycelial cultures were grown in Petri dishes with Potato

Dextrose Agar (PDA) medium and for scaling up, 50 ml Erlenmeyer flasks were used with 30 ml of Biotin-Aneurin-Folic Acid liquid medium (BAF). The growth conditions of *E. globulus* were optimized through the use of several substrates (composition and percentages). For the synthesis of ectomycorrhizas three different inoculation methods were tested - liquid inoculum, spore inoculum and soil traps. Throughout this essay, three evaluation moments were made to the aerial and root parts of the plants. The in vitro synthesis of *E. globulus* mycorrhizae with several species of edible fungi and by different inoculation methods was not successful. Despite this, a methodology of mycorrhization under controlled conditions was perfected through the selection of the best protocol for sterilization and seed germination, such as the best composition and percentages of substrates for the growth of *E. globulus*.

For the optimization of spawn production of *M. procera*, three mixtures of oats and wheat substrates were tested - 100 % oats, 100 % wheat and 70 % oats + 30 % wheat. Two different container types were used for the packaging of three mushroom production substrates - oak leaves + horse manure, wheat straw + horse manure and rice straw + horse manure - all with equal weights (1: 1). In the attempt to induce the formation of fruiting bodies, several stimuli were applied, such as the initial application of five casing layers recipes followed by two different treatments - with and without refrigeration - among others. The spawn growth in the 70 % oat + 30 % wheat mixture proved to be ideal for a rapid and healthy development of *M. procera* mycelium. Although with slight variations, all the substrates of mushroom production were highly colonized by the fungus. Mushrooms were not formed after the application of the various inducing stimuli of the formation of fruiting bodies. However, on substrates whose casing layer was leaf litter that did not undergo refrigeration stimulation, small dense masses of hyphae were obtained, similar to the structures that give rise to the fruiting bodies in nature.

This work has added new knowledge of extreme importance for the development of new protocols for the production of edible mushrooms as well as for the exploration of new mycorrhizal associations of great economic and biotechnological interest.

# Índice

<b>Capítulo 1 - Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1. Fungi - um reino único .....	1
1.2. Macrofungos.....	2
1.2.1 Fungos do filo Ascomycota.....	4
1.2.2 Fungos do filo Basidiomycota.....	5
1.3. Cogumelos Comestíveis.....	6
1.3.1. <i>Macrolepiota procera</i> , uma espécie saprófita comestível.....	8
1.3.2. Cogumelos comestíveis de fungos ectomicorrízicos.....	9
1.4. <i>Eucalyptus globulus</i> enquanto parceiro mutualista.....	12
1.5. Objetivos.....	13
<b>Capítulo 2 - Materiais e Métodos .....</b>	<b>15</b>
2.1. Caracterização das ectomicorrizas de <i>Eucalyptus globulus</i> + <i>Hydnum repandum</i> colhidas em condições naturais .....	15
2.1.1. Colheita de cogumelos e micorrizas.....	15
2.1.2. Análise molecular .....	16
2.1.3. Caracterização morfológica e anatômica das ectomicorrizas de <i>Hydnum</i> <i>repandum</i> .....	17
2.2. Síntese micorrízica <i>in vitro</i> : <i>Eucalyptus globulus</i> e diversos fungos ectomicorrízicos comestíveis .....	19
2.2.1. Material Vegetal .....	19
2.2.2. Material Fúngico.....	21
2.2.3. Identificação molecular das culturas puras.....	24
2.2.4. Otimização das condições de crescimento de <i>Eucalyptus globulus</i> .....	26
2.2.5. Síntese de ectomicorrizas.....	26
2.2.6. Avaliação das plantas de <i>Eucalyptus globulus</i> .....	28

2.2.7. Colonização micorrízica .....	29
2.3. Otimização das condições de crescimento de micélio e tentativa de frutificação de <i>Macrolepiota procera</i> .....	29
2.3.1. Material Fúngico.....	29
2.3.2. Otimização da produção de “semente” ( <i>Spawn</i> ) .....	30
2.3.3. Substratos para a produção de cogumelos de <i>Macrolepiota procera</i> .....	32
.....	33
2.3.4. Tentativa de indução da formação de corpos frutíferos.....	34
2.3.5. Inoculação e observação do crescimento de corpos frutíferos de <i>Macrolepiota procera</i> na natureza.....	35
<b>Capítulo 3 - Resultados .....</b>	<b>37</b>
3.1. Caracterização das ectomicorrizas de <i>Eucalyptus globulus</i> + <i>Hydnum repandum</i> colhidas em condições naturais .....	37
3.1.1. Análise molecular das micorrizas .....	37
.....	38
3.1.2. Caracterização morfológica e anatômica das ectomicorrizas de <i>Hydnum repandum</i> .....	38
.....	39
3.2. Síntese micorrízica <i>in vitro</i> : <i>Eucalyptus globulus</i> e diversos fungos ectomicorrízicos comestíveis .....	40
3.2.1. Isolamento das espécies fúngicas em cultura pura e aumento de escala .....	40
3.2.2. Confirmação molecular da identidade do material fúngico .....	41
3.2.3. Efeito de diversos protocolos na esterilização e germinação de sementes de <i>Eucalyptus globulus</i> .....	41
3.2.4. Efeito dos substratos no comportamento das plantas (Otimização das condições de crescimento de <i>Eucalyptus globulus</i> ) .....	42
3.2.5. Avaliação das Plantas de <i>Eucalyptus globulus</i> e da colonização micorrízica ....	43
3.3. Otimização das condições de crescimento de micélio e tentativa de frutificação de <i>Macrolepiota procera</i> .....	44

3.3.1. Crescimento e otimização da <i>spawn</i> .....	44
3.3.2. Efeito dos diferentes substratos de produção e recipientes no crescimento do micélio .....	45
3.3.3. Tentativa de indução da formação de corpos frutíferos.....	46
<b>Capítulo 4 - Discussão .....</b>	<b>53</b>
4.1. Caracterização das ectomicorrizas de <i>Eucalyptus globulus</i> + <i>Hydnum repandum</i> colhidas em condições naturais .....	53
4.2. Síntese micorrízica <i>in vitro</i> : <i>Eucalyptus globulus</i> e diversos fungos ectomicorrízicos comestíveis .....	54
4.3. Otimização das condições de crescimento de micélio e tentativa de frutificação de <i>Macrolepiota procera</i> .....	60
<b>Capítulo 5 - Conclusão .....</b>	<b>65</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>69</b>

## Índice de Figuras

Figura 1.1: Ciclo de vida de um Ascomicete (Retirado de A. Campbell, 1999) .....	5
Figura 1.2: Ciclo de vida de um Basidiomicete (Retirado de A. Campbell, 1999) .....	6
Figura 2.1: Colheita de amostras de solo e raízes numa área dominada exclusivamente por <i>Eucalyptus globulus</i> (A); corpo frutífero de <i>Hydnum repandum</i> (B e C) .....	15
Figura 2.2: Blocos resultantes dos dois métodos de impregnação: parafina (A); resina - pormenor do alinhamento das micorrizas e da superfície convexa (B).....	18
Figura 2.3: Material utilizado no protocolo 1 - na câmara de fluxo laminar .....	21
Figura 2.4: Material fúngico e vegetal usado no presente estudo. Corpos frutíferos de <i>Boletus edulis</i> (A), <i>Boletus fragrans</i> (B), <i>Tricholoma portentosum</i> ( <a href="http://mykoweb.com">http://mykoweb.com</a> ) (C), <i>Tricholoma equestre</i> ( <a href="http://mykoweb.com">http://mykoweb.com</a> ) (D), <i>Hydnum repandum</i> (E), <i>Lactarius deliciosus</i> ( <a href="http://mykoweb.com">http://mykoweb.com</a> ) (F) e <i>Pisolithus tinctorius</i> (H). <i>Eucalyptus globulus</i> (G) e cápsulas com as sementes a negro (I).....	22
Figura 2.5: Balões de Erlenmeyer utilizados para o aumento de escala (A); <i>Eucalyptus globulus</i> 21 dias após terem sido transferidas para dentro dos recipientes (B); Recipientes distribuídos de forma aleatória dentro da estufa de crescimento (C).....	28
Figura 2.6: Corpo frutífero de <i>Macrolepiota procera</i> .....	30
Figura 2.7: Etapas desde o crescimento do micélio em caixas de Petri (A), passando por aumento de escala: em cultura líquida (B) e numa mistura 70 % aveia + 30 % trigo (C e D); até à inoculação em sacos de autoclave (E) e recipientes com tampa com filtro HEPA (F) ..	33
Figura 2.8: Local da inoculação de <i>Macrolepiota procera</i> na natureza (A); Distância entre o local de colheita do cogumelo <i>Macrolepiota procera</i> e o local da inoculação (B) ( <a href="https://www.google.com/maps">https://www.google.com/maps</a> ) .....	36
Figura 3.1: Bandas resultantes da eletroforese em gel de agarose de diferentes morfotipos de micorrizas e do template da reação. <i>Rhizodermea veluwensis</i> (P2); <i>Descolea maculata</i> (P3 e X6); <i>Hydnum repandum</i> (C7) .....	37



Figura 3.2: Ectomicorriza da espécie <i>Hydnum repandum</i> em associação com <i>Eucalyptus globulus</i> . Barra = 10 mm.....	39
Figura 3.3: Cortes transversais das ectomicorrizas da espécie <i>Hydnum repandum</i> em associação com <i>Eucalyptus globulus</i> impregnadas em parafina (A) e resina (B). 1 – manto, 2 – rede de Hartig cortical .....	39
Figura 3.4: Caixa de Petri com explantes de <i>Hydnum repandum</i> contaminados .....	40
Figura 3.5: Recipientes com os volumes de substrato 300 ml, 200 ml e 100 ml de Perlite + Turfa (1:1) (da esquerda para a direita) .....	42
Figura 3.6: Sacos de autoclave colonizados com <i>Macrolepiota procera</i> . Misturas (1:1) de: palha de arroz + estrume de cavalo (A e E); palha de trigo + estrume de cavalo (B e D); folhas de carvalho + estrume de cavalo (C) .....	46
Figura 3.7: Colonização superficial dos substratos com terra de cobertura à base de turfa: antes (A), após o primeiro (B) e após o segundo (C) tratamentos.....	47
Figura 3.8: Pequenas massas densas de hifas, de <i>Macrolepiota procera</i> , em certos pontos da superfície da terra de cobertura com manta morta, após o primeiro tratamento .....	48
Figura 3.9: Formação de elevada densidade de hifas à superfície das terras de cobertura após aplicação do segundo tratamento .....	49
Figura 3.10: Estrutura onde se iniciou a formação do corpo frutífero na natureza (A); pequena massa de micélio formada à superfície da terra de cobertura com manta morta em condições laboratoriais (B).....	51
Figura 3.11: Degeneração do micélio de <i>Macrolepiota procera</i> .....	52

## Índice de Tabelas

Tabela 2.1: Fungos ectomicorrízicos usados neste estudo, proveniência, habitat, data de colheita, sucesso no isolamento e código de coleção.....	385
Tabela 3.1: Detalhes da análise molecular aos diferentes morfotipos.....	38
Tabela 3.2: Detalhes da análise molecular das culturas puras e do corpo frutífero de <i>Hydnum repandum</i> .....	41
Tabela 3.3: Número e percentagem de germinação e contaminação, nos quatro métodos utilizados, para esterilização superficial de sementes em <i>Eucalyptus globulus</i> .....	42
Tabela 3.4: Plantação e sobrevivência das plântulas de <i>Eucalyptus globulus</i> nos diferentes substratos e volumes de meio MS adicionado. “—” Não foi possível plantar as plântulas devido ao excesso de meio líquido; “⊖” As plantas não sobreviveram aos dois meses da experiência; “+” As plantas sobreviveram aos dois meses da experiência.....	43
Tabela 3.5: Detalhe da análise molecular à cultura pura de <i>Macrolepiota procera</i> .....	45
Tabela 3.6: Resultados do primeiro tratamento para a indução da formação de corpos frutíferos.....	50
Tabela 3.7: Resultados do segundo tratamento para a indução da formação de corpos frutíferos.....	50
Tabela suplementar 1: Valores resultantes da primeira avaliação das plantas.....	67
Tabela suplementar 2: Valores resultantes da segunda avaliação das plantas.....	67
Tabela suplementar 3: Valores resultantes da terceira avaliação das plantas utilizadas como controlo negativo.....	68

# Capítulo 1 - Introdução

## 1.1. Fungi - um reino único

O reino Fungi engloba uma grande diversidade de organismos eucarióticos, micro e macroscópicos, profundamente distintos das plantas e dos animais e que se encontra distribuído por todas as zonas da Terra [1]. Os fungos são seres heterotróficos que apresentam nutrição por absorção e a principal substância de reserva é o glicogénio. As células fúngicas são envolvidas por uma parede celular cuja estrutura é semelhante à das bactérias, plantas e certos protistas. No entanto, ao contrário das paredes celulares desses organismos, as paredes celulares fúngicas contêm quitina, um polissacarídeo nitrogenado, mais resistente à degradação microbiana do que a celulose e geralmente presente no exosqueleto dos insetos e de outros artrópodes [1], [2]. Os fungos podem ser unicelulares (leveduras), mas a maioria é multicelular; podem desenvolver-se em diversos ambientes, mas preferem locais húmidos e com pouca luz [3]. Os fungos unicelulares, as leveduras, são redondos ou ovais; os multicelulares são constituídos por filamentos, as hifas, que no seu conjunto formam o micélio. As hifas podem ser cenocíticas – sem septose, por isso multinucleadas, ou estarem divididas em compartimentos por septos, perfurados com poros, que permitem ao citoplasma e aos núcleos deslocarem-se de uns para os outros, como acontece nos filos Ascomycota e Basidiomycota [2], [4], [5]. A reprodução pode ser sexuada ou assexuada [6]. A primeira ocorre por fusão de hifas de tipos sexuais diferentes; a segunda pode ocorrer por gemulação, como nas leveduras, por esporulação, como em *Penicillium*, ou simplesmente por fragmentação do micélio [2], [4].

Estimativas recentes indicam que existem 2,2 a 3,8 milhões de espécies de fungos, dos quais apenas 3 % a 8 % foram descritos [7].

De acordo com o tipo de nutrição, os fungos podem ser saprófitas, mutualistas ou parasitas [8]. Os fungos saprófitas produzem uma ampla gama de enzimas extracelulares que decompõem a matéria orgânica morta, incluindo polímeros complexos, como a celulose e a lenhina, em monómeros que são posteriormente captados por absorção. Juntamente com as bactérias heterotróficas, os fungos são os principais decompositores

dos ecossistemas [4], [5], [9], [10]. Esta capacidade permite-lhes desempenhar um papel crucial na reciclagem de nutrientes na natureza, tornando-os adequados para a biorremediação de áreas poluídas [11]–[13].

Os fungos mutualistas micorrízicos desempenham igualmente um papel muito importante nos ecossistemas. As micorrizas, cuja tradução literal é “raiz do fungo”, são associações simbióticas de fungos com as raízes das plantas, com benefício para os simbiontes. Estima-se que estejam presentes em pelo menos 80% de todas as plantas vasculares [4], [14]. Tendo em conta os taxa dos fungos, das plantas e as características morfológicas e anatómicas das micorrizas, são hoje reconhecidos sete tipos: micorrizas arbusculares, ectomicorrizas, ectendomicorrizas, arbutóides, ericóides, monotrepóides e orquidóides [8].

As ectomicorrizas são caracterizadas pela formação de um manto externo de hifas que envolve a raiz e por uma estrutura típica – a rede de Hartig, que resulta das hifas que penetram entre as células epidérmicas ou corticais da raiz da planta [4]. O manto é responsável pelo armazenamento de nutrientes e a rede de Hartig é a interface preferencial das trocas planta - fungo. As hifas extrarradiculares permitem a interação entre o fungo e o solo [8].

Plantas com ectomicorrizas beneficiam na obtenção de nutrientes e de água, devido ao aumento de volume de solo explorado pelo fungo [15], podendo tolerar melhor condições abióticas adversas, tais como altas temperaturas do solo e seca, e ainda stresses bióticos [2], [8], [16]. Esta relação mutualista pode fornecer até 80% do azoto e fósforo das plantas, melhorando o seu *fitness* e, por vezes, o crescimento da planta [17]. Em troca, o fungo recebe carbono orgânico produzido pela fotossíntese [2]. As ectomicorrizas também têm um papel crucial na manutenção e melhoria da biodiversidade do solo, auxiliando no funcionamento do ecossistema [18], [19].

Atualmente são aceites oito filos para o reino Fungi: Ascomycota, Basidiomycota, Mucoromycota, Zoopagomycota, Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Cryptomycota e Microsporidia [20]. Os macrofungos, sobre os quais incide o presente trabalho, pertencem aos filos Ascomycota e Basidiomycota.

## **1.2. Macrofungos**

Os filios Ascomycota e Basidiomycota caracterizam-se por possuírem hifas septadas que podem ter um ou dois núcleos. Apesar das hifas septadas estarem presentes também em algumas espécies de outros filios, a principal característica estrutural que representa uma novidade evolutiva dos Ascomycota e Basidiomycota é a presença de hifas dicarióticas ( $n+n$ ), o que significa que possuem dois núcleos haploides compatíveis. Nos Ascomycota esta estrutura é efémera, ocorrendo em apenas algumas células da estrutura sexual reprodutora; nos Basidiomycota, no entanto, pode estar presente na maior parte do ciclo de vida do fungo [1]. Os estudos que defendem a existência de um ancestral comum para estes filios baseiam-se nas muitas características semelhantes que os seus taxa apresentam, nomeadamente a produção de corpos frutíferos, em alguns géneros destes filios. A sua separação parece ter ocorrido há aproximadamente 400 milhões de anos, depois de as plantas terem colonizado a terra [21]. É a presença destes corpos frutíferos carnosos, visíveis a olho nu ( $\geq 2$  mm), que justifica a designação de macrofungos [4], [22]. Nestes corpos são produzidos esporos de origem sexuada, que são meiosporos, ou seja, são produto da cariogamia e meiose. Na maior parte dos indivíduos destes filios a cariogamia não ocorre imediatamente a seguir à plasmogamia pelo que os núcleos haploides compatíveis permanecem lado a lado dando origem a hifas dicarióticas, que podem persistir por longos períodos de tempo. Quando ocorre cariogamia forma-se um zigoto diploide que, por meiose, leva à formação dos meiosporos que ao germinarem originam um novo micélio [1], [10].

A principal diferença entre os filios Ascomycota e Basidiomycota reside no tipo de esporângios e esporos que são produzidos durante a fase sexuada do ciclo de vida destes fungos. Assim, os Ascomycota possuem esporângios em forma de saco, denominados ascos, que por meiose formam ascósporos os quais, por se formarem no interior dos ascos, são endósporos. Nos Basidiomycota, os esporângios são denominados basídios e originam, por meiose, basidiósporos, que ao contrário dos ascósporos são exósporos, uma vez que se formam externamente, por estrangulamento da membrana do basídio [2], [4], [10].

O termo cogumelo é utilizado pelo cidadão comum para designar o corpo frutífero de um fungo. Segundo Chang e Miles [23], a utilização deste termo é correta uma vez que

consideram que “um cogumelo é um macrofungo com um corpo frutífero distinto que pode ser tanto epígeo (acima do solo) como hipógeo (subterrâneo) e grande o suficiente para ser visto a olho nu e colhido à mão”.

### **1.2.1. Fungos do filo Ascomycota**

O filo Ascomycota contém cerca de 75 % das espécies de fungos conhecidas e é o maior grupo de fungos existente. Podem ser unicelulares, como as leveduras, mas a maioria é multicelular, apresentando um micélio formado por hifas septadas bem desenvolvidas. O micélio na maior parte do seu ciclo de vida é haploide ou dicariótico. Podem reproduzir-se assexuada e sexuadamente [1]. Na maioria das espécies a reprodução assexuada ocorre através da formação de conídios, formados no ápice de hifas modificadas denominadas conidióforos. A reprodução sexuada envolve a formação de um esporângio característico – o asco, que por meiose, produz esporos sexuais haploides – os ascósporos (Fig. 1.1). O asco é uma estrutura saculiforme que pode ou não estar no interior de ascomas (estrutura complexa formada por hifas entrelaçadas e compactadas) e que é formado por dois núcleos haploides compatíveis de diferentes “*mating types*” que se fundem para formar um núcleo diplóide. Este núcleo divide-se por meiose, originando quatro núcleos, cada um dos quais sofre uma mitose, dando origem a oito núcleos filhos, que se diferenciam em oito ascósporos uninucleados. A maioria das espécies produz oito ascósporos por asco, no entanto são conhecidas outras espécies em que o número de ascósporos por asco é maior ou menor, sendo, no entanto, sempre múltiplo de quatro. Este processo acontece numa estrutura chamada ascocarpo ou corpo frutífero, onde muitos ascos são produzidos. A camada de ascos é denominada himénio, ou camada himenial [10], [24].

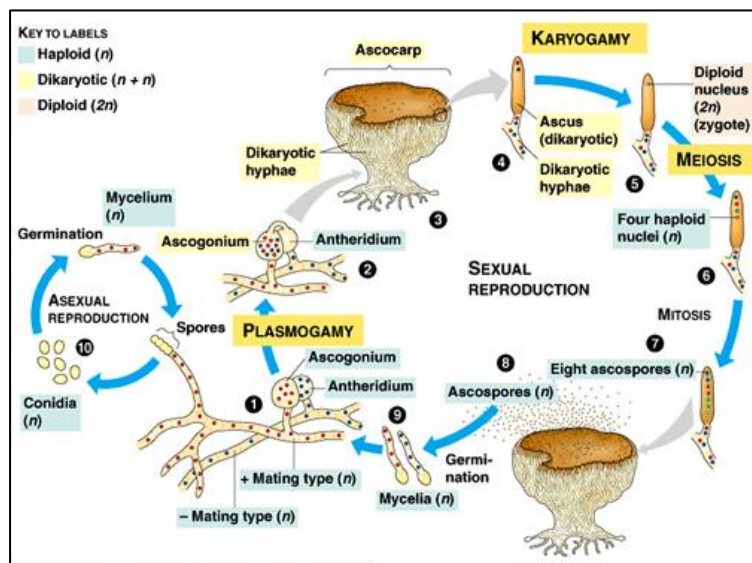


Figura 1.1: Ciclo de vida de um Ascomicete (Retirado de A. Campbell, 1999)

Os micélios cultivados a partir de ascósporos retirados de um mesmo asco têm sido utilizados, ao longo das últimas décadas em inúmeras pesquisas de Genética, uma vez que as diferenças genéticas que apresentam constituem uma oportunidade única para estudar a recombinação genética [10].

### 1.2.2. Fungos do filo Basidiomycota

Na maior parte do ciclo de vida dos fungos do filo Basidiomycota (Fig. 1.2), as hifas que os constituem possuem dois núcleos. Estas hifas binucleadas são responsáveis pela formação dos corpos frutíferos ou basidiocarpos, que são as estruturas onde ocorre a produção de esporos sexuais - os basidiósporos. Numa porção especializada do basidiocarpo - o himénio, diferenciam-se a partir das células dicarióticas, os basídios.

Estas estruturas, características do filo, são especializadas na produção de esporos exógenos em número de 4, ou múltiplos de 2. O seu desenvolvimento inicia-se com o aumento de tamanho de cada basídio e com a fusão dos seus dois núcleos haploides, originando um núcleo diploide. Após ocorrer a cariogamia, o núcleo diplóide migra para o ápice do basídio e divide-se por meiose em quatro. Há espécies em que cada um destes núcleos volta a dividir-se por mitose, formando no interior do basídio oito núcleos. Em seguida, na parte distal do basídio formam-se delgados prolongamentos citoplasmáticos

externos denominados esterigmas. Cada um dos esterigmas formados sofre uma dilatação terminal na qual penetra um dos núcleos do basídio que, ao separar-se, dá origem a um basidiósporo haploide. Quando ocorre a dispersão dos basidiósporos, eles germinam originando hifas haploides. Quando duas destas hifas se encontram, fundem os seus citoplasmas (plasmogamia) e regenera-se o estado de hifa binucleada inicial [1], [10].

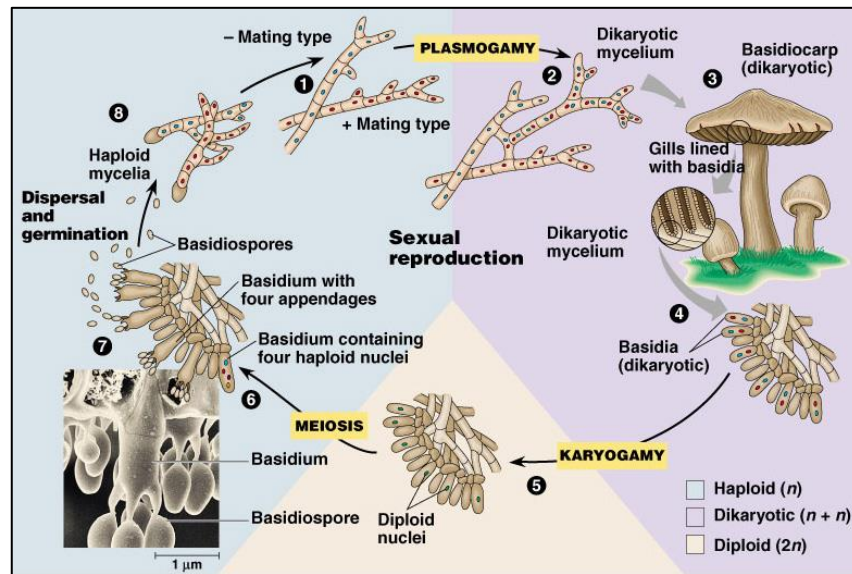


Figura 1.2: Ciclo de vida de um Basidiomicete (Retirado de A. Campbell, 1999)

### 1.3. Cogumelos Comestíveis

Os corpos frutíferos de muitos macrofungos apresentam uma grande diversidade de cores, tamanhos e alguns até libertam aromas fortes, com o objetivo de atrair animais como mamíferos e insetos que ao alimentarem-se destes atuam como agentes de dispersão dos seus esporos. Os seres humanos também os utilizam na sua alimentação [10]. Estes corpos frutíferos carnosos comestíveis, possuem um elevado valor nutricional, gastronómico e até medicinal [25]–[27]. No entanto, alguns cogumelos possuem um grande número de toxinas extremamente venenosas e potencialmente fatais, sendo que a colheita de cogumelos na natureza para consumo, só deve ser feita pelas pessoas com conhecimento [28].

Os cogumelos utilizados para venda, que podem provir da natureza (silvestres) ou ser cultivados, podem ter fins comestíveis ou medicinais. Esta atividade está avaliada em



quarenta e dois mil milhões de dólares, em 2018 [29]. Os cogumelos comestíveis, particularmente os silvestres, continuam a ser uma importante fonte de alimento e de rendimento para muitas pessoas [30]. Dados de 2018, do Royal Botanic Gardens, Kew, afirmam que pelo menos trezentas e cinquenta espécies de fungos são consumidas como alimento [29]. Os cogumelos usados para fins medicinais produzem metabolitos primários e secundários que têm propriedades terapêuticas como por exemplo as antidiabéticas, anticancerígenas, anticolesterolémicas e antivirais [27], [31]–[37].

O cultivo de cogumelos comestíveis em todo o mundo aumentou de um milhão de toneladas em 1978 para trinta e quatro milhões de toneladas em 2013, sendo a China o maior produtor com cerca de trinta milhões de toneladas. Neste ano, a China, a União Europeia e a Índia conseguiram garantir o seu próprio consumo de cogumelos, enquanto a Austrália, o Canadá, o Japão e os Estados Unidos necessitaram de importar este recurso para satisfazer as necessidades dos seus mercados [38]. Este enorme consumo pode ser justificado pelas suas qualidades organolépticas, aliadas à riqueza nutricional em proteínas, fibras, vitaminas, minerais e baixos níveis de gordura [39], [40].

Os nossos ancestrais pré-históricos, provavelmente colhiam cogumelos silvestres como fonte de alimento e também, possivelmente, para fins medicinais. Civilizações antigas como os romanos, egípcios, gregos e chineses usavam-nos não só como alimento, mas também em cerimónias religiosas [5]. Foi apenas uma questão de tempo até a nossa espécie aprender a cultivar cogumelos. O primeiro vestígio de cultivo de cogumelos saprófitas comestíveis foi encontrado na China, no ano 600 D. C., onde ocorreu a produção de *Auricularia auricula* em troncos de madeira. Em seguida, há registos da produção da espécie *Flammulina velutipes* e mais tarde da espécie medicinal *Ganoderma lucidum* [5], [27]. Na Europa, os primeiros relatos são do século XVII, com o cultivo em substrato compostado de micélio de *Agaricus bisporus* [41]. Nas últimas décadas, espécies saprófitas como *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes* têm aumentado a sua popularidade no mercado alimentar, estando atualmente ao mesmo nível da espécie *Agaricus bisporus* [42], [43]. Devido ao crescimento da procura associado ao elevado valor económico destes cogumelos, existe muito interesse no seu cultivo [44].

Atualmente, a maioria dos cogumelos cultivados pertencem a espécies saprófitas. A espécie *Pleurotus ostreatus* é cultivada em substratos baratos como palha não compostada, estilhas de madeira e em outros resíduos agrícolas [45], [46]. A espécie *Lentinula edodes* é geralmente inoculada em troncos de carvalho recém cortados ou numa mistura de serradura, farelo de cereais e carbonato de cálcio [47], [48]. Já a espécie *Agaricus bisporus* cresce apenas em substratos compostados enriquecidos com gesso. Estes substratos compostados resultam de uma mistura de palhas de diferentes espécies de cereais com estrume de cavalo ou de galinha, deixados a compostar durante algumas semanas [41]. É de crucial importância a adição de uma terra de cobertura durante o processo de crescimento do micélio no substrato para manter a humidade do micélio elevada, garantir as suas necessidades nutricionais, bem como proteger de possíveis contaminações [5], [41].

Outros cogumelos com valor gastronómico e económico serão de seguida apresentados.

### **1.3.1. *Macrolepiota procera*, uma espécie saprófita comestível**

Numerosas espécies de cogumelos saprófitas comestíveis são já cultivadas [41].

A espécie *Macrolepiota procera* (Basidiomycota) é uma das poucas que ainda não é cultivada; frutifica no outono, estando apenas disponível na natureza por curtos períodos de tempo. É colhida para consumo humano na Europa, América do Norte, norte da África e Ásia [49]. Conhecida em Portugal pelos nomes vulgares de frade, marifusa ou tortulho, é amplamente procurada pelo seu elevado valor nutricional e gastronómico, devido ao seu ligeiro sabor a nozes [50], [51]. Estudos recentes, apontam que esta espécie poderá vir a ser usada como agente biológico na luta contra alguns tipos de neoplasias [52], [53]. No entanto, outros estudos, apontam esta espécie como bioacumuladora de metais como o cádmio, o mercúrio, o cobre e o polónio, sendo que o seu consumo regular ou em grandes quantidades, poderá ser tóxico [54], [55].

Cresce solitário ou em pequenos grupos, pode aparecer em campos abandonados onde se deposita muita matéria orgânica, em parques e bosques abertos com espécies do género *Pinus* e *Quercus* [50]. Embora já existam alguns trabalhos científicos publicados

sobre a otimização de culturas puras de micélio [56], [57] e tentativas de produção de corpos frutíferos [58], [59], até hoje não são conhecidos relatos bem sucedidos. O maior problema parece ser a transição do estado de micélio vegetativo para a formação de corpos frutíferos.

Na natureza, a formação dos basidiocarpos é influenciada pelas mudanças sazonais, pelo que a produção de cogumelos em recintos fechados deverá ser induzida pelos mesmos estímulos que a provocam no seu meio ambiente [41]. Os estímulos aplicados na maioria das espécies cultivadas são: o abaixamento da temperatura para uma temperatura inferior à ótima do crescimento do micélio; a remoção de excesso de dióxido de carbono por ventilação; o aumento dos níveis de humidade no substrato e na atmosfera circundante; a submersão em água para hidratar e diminuir os níveis de oxigénio; os choques mecânicos ou elétricos. Em várias espécies, aplica-se uma terra de cobertura a revestir o topo do substrato colonizado evitando a desidratação do mesmo. Este procedimento fornece um microclima húmido para a formação de cogumelos, podendo aumentar a formação de corpos frutíferos, devido aos muitos microorganismos presentes na terra de cobertura e que estão associados à sua formação, entre outros já referidos [5], [41].

Os estímulos para a formação de corpos de frutificação da espécie *M. procera* são complexos e difíceis de descodificar e têm constituído um obstáculo ao cultivo de cogumelos, sendo necessários mais estudos para se entender quais os que estimulam a produção de cogumelos nesta espécie.

### **1.3.2. Cogumelos comestíveis de fungos ectomicorrízicos**

Estima-se que existam mais de cento e quarenta espécies de fungos ectomicorrízicos consideradas como comestíveis [65], porém só uma pequena parte foi cultivada à escala comercial e sempre em associação com um parceiro vegetal.

A gestão de povoamentos florestais tem tido uma importância crescente na Europa uma vez que podem vir a ser usados para cultivo de espécies como *Tuber* spp. [60], [61] e *Terfezia* spp. [62], pertencentes ao filo Ascomycota, que fornecem corpos frutíferos muito lucrativos [63]. As espécies do filo Basidiomycota *Lactarius deliciosus* [64], [65],

*Boletus edulis* [66], *Boletus fragrans* [67], *Tricholoma equestre* [68] e *Tricholoma portentosum* [69] produzem cogumelos altamente nutritivos e valorizados, existindo já vários estudos de micorrização *in vitro*.

Os fatores que influenciam a formação dos corpos frutíferos ainda não são totalmente conhecidos. Embora os fungos ectomicorrízicos possuam alguma capacidade saprofítica, estes não os conseguem produzir na ausência de um parceiro vegetal [4]. Geralmente, estes parceiros vegetais demoram um longo período de tempo até conseguirem sustentar a reprodução sexuada dos seus parceiros fúngicos [70]. A riqueza de espécies de fungos ectomicorrízicos, assim como a abundância de corpos frutíferos, varia de acordo com a idade do parceiro vegetal. Assim, os termos “*early-stage-fungi*” e “*late-stage-fungi*” são usados para explicar a sucessão das espécies de fungos ectomicorrízicos presentes ao longo do tempo nos povoamentos florestais [71], [72]. Fatores como a genética dos fungos e do parceiro vegetal, as condições ambientais e fisiológicas, o estado nutricional do micélio e do parceiro vegetal explicam esta sucessão na formação de corpos frutíferos em fungos ectomicorrízicos [73]–[75]. Além dos fatores previamente descritos, as “*mycorrhization helper bacteria*” [76], os fluxos de nutrientes com outros fungos ectomicorrízicos e uma gestão florestal sustentável podem ajudar no estabelecimento e desenvolvimento destas associações micorrízicas e vir a promover o aparecimento de corpos frutíferos, contudo este processo ainda não está totalmente esclarecido [63].

Em Portugal, existem várias espécies de cogumelos ectomicorrízicos comestíveis com grande interesse económico que são colhidas para consumo local e também para exportação [77]. Um bom exemplo disso são as espécies de Basidiomicetes:

- *Boletus fragrans* que ocorre em florestas de carvalhos e castanheiros, estando amplamente distribuídas um pouco por toda a Europa e América do Norte [78]. É uma espécie cuja carne tem tom amarelo limão e elevado potencial antioxidante [79];

- *Boletus edulis* que é encontrada associada a bétulas, carvalhos e faias em todo o hemisfério norte. As frutificações crescem individualmente dispersas umas das outras ou em pequenos grupos, como em todas as espécies de *Boletus*. A sua carne apresenta

tonalidade branco acastanhado, com um forte e distinto sabor, muito apreciada desde os romanos [80];

- *Hydnun repandum* que cresce associado a faias e a pinheiros, estando amplamente distribuída pela Europa, Ásia e América do Norte [78]. As frutificações aparecem solitárias ou em pequenos grupos, caracterizam-se por ter uma cor rosa salmão e pequenas agulhas esbranquiçadas na zona do himénio [81]. Estudos anteriores tentaram, sem sucesso, o crescimento *in vitro* desta espécie associada a *Eucalyptus globulus* [82];

- *Lactarius deliciosus* que é encontrada maioritariamente associada a coníferas em toda a Europa e América do Norte. Cogumelo de cor alaranjada, apresentando um pé com orbículos laranja. O chapéu e as lâminas tendem a ficar verdes ao toque e quando cortados exsudam um látex cor de cenoura. Estas últimas características permitem distinguir facilmente esta espécie de outras espécies do mesmo género, como por exemplo do *Lactarius chrysorrheus* [78]. É colhido e muito apreciado nos mercados europeus locais [83];

- *Tricholoma equestre* que cresce maioritariamente em solos arenosos costeiros dominados por diversas espécies de pinheiros na Europa [77]. Devido a alguns casos de toxicidade, recentemente relatados em França, este cogumelo de lâminas amarelo vivo, foi proibido para a comercialização nos mercados de França, Itália e Espanha [84], [85]. Em Portugal essa proibição não vigora e como tal continua a ser muito apreciado e amplamente comercializado, chegando a ser um dos cogumelos silvestres mais consumidos no país;

- *Tricholoma portentosum* que aparece em densas florestas de pinheiros na Europa e na América do Norte, apresenta um chapéu cinzento arroxeadado com o himénio e o pé do cogumelo a apresentarem uma cor branco sujo [78], [81]. Têm sido feitos alguns estudos com esta espécie com vista a uma tentativa controlada de produção de corpos frutíferos, uma vez que estes são reconhecidos por possuírem diversas propriedades benéficas [86], [87].

## 1.4. *Eucalyptus globulus* enquanto parceiro mutualista

A espécie *Eucalyptus globulus*, nativa do sudeste da Austrália, tem uma elevada taxa de crescimento, conseguindo adaptar-se facilmente às condições de praticamente qualquer solo, podendo chegar a atingir mais de 40-60 metros de altura [88], [89]. As plantações desta espécie na Europa começaram em meados do século XIX [90]. Em Portugal é a principal espécie do género *Eucalyptus* a ser cultivada, sendo que entre 1995 e 2010 as plantações de eucaliptos cresceram 13%, ocupando atualmente cerca de 812 mil hectares de área continental portuguesa [90], [91]. A madeira é utilizada na indústria de celulose, pelo que estas plantações constituem fontes de rendimento apreciáveis [92]–[94]. A obtenção de eucaliptol, um óleo essencial extraído das folhas de eucalipto, constitui outra fonte de rendimento uma vez que tem aplicações farmacêuticas e industriais [95], [96]. Estas plantações têm ainda valor como “flora apícola”, uma vez que apresentam florações prolongadas, com grande fluxo nectarífero, fornecendo pólen e néctar para a produção de mel [97].

Todas as espécies de eucaliptos possuem fungos ectomicorrízicos associados às suas raízes [98]. Este mutualismo é importante na regeneração e reabilitação do solo, protegendo-o da erosão da água e do vento [99]–[101]. Muitas das espécies de fungos ectomicorrízicos produzem cogumelos comestíveis. Por exemplo, corpos frutíferos de fungos do género *Lactarius* foram observados em plantações de *E. globulus* [102]. A presença de corpos frutíferos das espécies *B. fragrans* [103] e *H. repandum* também já foi documentada em plantações de *E. globulus*, com o aparecimento desta última espécie fúngica a ser relatada em plantações de *E. globulus* com seis anos de idade [102].

Em 2017, com os incêndios mortíferos que assolaram Portugal, intensificou-se o debate acerca do ordenamento florestal e da gestão das áreas florestais. Apesar das controvérsias e de algumas decisões políticas que vieram sobretudo visar a redução da área de plantações de eucaliptos, estas continuarão a fazer parte de grandes áreas florestais em Portugal, uma vez que constituem uma fonte de rendimento importante para muitas populações. Para além da desejável melhoria do ordenamento florestal, a micorrização com cogumelos comestíveis de *E. globulus*, poderá ser uma maneira muito

interessante não apenas de se obter um rendimento secundário das plantações de eucaliptos, mas também de garantir uma gestão mais ativa e cuidada destas, através da presença humana regular.

## 1.5. Objetivos

O principal objetivo desta dissertação prende-se com a produção de cogumelos comestíveis, incluindo espécies ectomicorrízicas e saprófitas. Consoante o grupo funcional dos fungos, pretende-se ainda contribuir para i) a melhor gestão e rentabilização das extensas áreas de plantações de eucaliptos da espécie *Eucalyptus globulus*, espécie exótica em Portugal, onde ocupa uma grande área florestal; ii) produção de cogumelos da espécie saprófita *Macrolepiota procera* com a utilização de resíduos agrícolas.

De acordo com os objetivos gerais enunciados, o trabalho de investigação descrito teve os seguintes objetivos específicos:

- Caracterizar a morfologia e a anatomia das ectomicorrizas resultantes da relação mutualista entre a espécie fúngica *Hydnum repandum* e a espécie vegetal *E. globulus*, em condições naturais.

- Explorar os potenciais simbiontes ectomicorrízicos de *E. globulus*, através da realização de ensaios *in vitro* com *Boletus edulis*, *B. fragrans*, *H. repandum*, *Lactarius deliciosus*, *Tricholoma equestre* e *T. portentosum*, com vista à produção de cogumelos comestíveis em plantações de eucaliptos.

- Otimizar as condições de cultura de *M. procera*, nomeadamente substratos para a produção de *spawn* bem como substratos e estímulos para indução da formação de corpos frutíferos.





## Capítulo 2 - Materiais e Métodos

### 2.1. Caracterização das ectomicorrizas de *Eucalyptus globulus* + *Hydnum repandum* colhidas em condições naturais

#### 2.1.1. Colheita de cogumelos e micorrizas

O local de estudo utilizado para a colheita de cogumelos e de micorrizas de *Hydnum repandum* foi uma plantação de eucaliptos, coordenadas geográficas 40°16'25.5"N 8°23'18.7"W, localizado em Brasfemes, próximo de Coimbra, visitado no dia dezasseis de janeiro de 2018. Foram identificados corpos frutíferos da espécie *H. repandum* [78] e procedeu-se ao levantamento de todas as espécies arbóreas e arbustivas num raio de 10 metros de cada eucalipto, tendo-se verificado não existir outra espécie além de *Eucalyptus globulus* (Fig. 2.1).



Figura 2.1: Colheita de amostras de solo e raízes numa área dominada exclusivamente por *Eucalyptus globulus* (A); corpo frutífero de *Hydnum repandum* (B e C)

Para a recolha das micorrizas seguiu-se o micélio a partir da base do corpo frutífero

até encontrar raízes de *E. globulus* (a aproximadamente 5 cm de profundidade) [104]. Recolheram-se cuidadosamente várias amostras, cada uma com 50 g de solo contendo raízes, que foram guardadas em sacos estéreis para posterior análise. Algumas destas amostras foram conservados a 3 °C, para posterior aplicação num método de inoculação do subtópico **2.2.5**.

No laboratório, as raízes foram separadas do solo e cuidadosamente lavadas com água e detergente Tween 20, durante 30 min, sendo posteriormente observadas à lupa binocular Leica EZ4 HD. As micorrizas foram separadas e classificadas em "grupos morfológicos adhoc" [105] com base na forma, ramificações, textura, cor e presença de hifas emergentes ou de rizomorfos [106]. Os exemplares de cada morfotipo (grupo morfológico) foram fotografados numa lupa binocular Leica EZ4 HD com recurso ao software Leica LAS EZ. Seguidamente, os exemplares foram guardados em 1 mL de álcool a 96 %, em Eppendorfs de 1.5 mL, à temperatura de -20 °C.

### **2.1.2. Análise molecular**

Os diferentes morfotipos de micorrizas foram retirados de dentro dos Eppendorfs de 1.5 mL e usou-se aproximadamente 1 mm<sup>2</sup> de cada ponta micorrízica para a extração do ADN. Usou-se igualmente 1 mm<sup>2</sup> de corpo frutífero de *H. repandum*. Extrauiu-se o ADN através do uso do Kit REExtract-N-Amp<sup>TM</sup> (SIGMA-ALDRICH®Company) por meio de um protocolo modificado. Para tal adicionou-se 20 µL de solução de extrato (Extract Solution) ao material biológico para em seguida serem incubadas em três diferentes etapas de temperatura: primeiro 94 °C durante 10 min, seguido por 60 °C durante 13 min e por fim a 10 °C durante 15 min. Após este período de incubação, adicionou-se um volume igual de solução de diluição (Dilute Solution). Para finalizar o processo de extração e tornar mais eficiente o processo de amplificação do ADN extraído, este foi diluído 1:20 antes da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

A reação de PCR foi realizada no termociclador T100<sup>TM</sup> Termal Cycler da Bio-Rad, utilizando o par de primers ITS1F/ITS4, habitualmente utilizados para "barcoding" de fungos [107], [108] juntamente com a Master Mix NZYLong 2x Green da NZYtech<sup>TM</sup>. Foram utilizados os seguintes parâmetros no termociclador: em primeiro lugar

desnaturação inicial a 95 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos a 95 °C durante 45 s, 57 °C durante 45 s e 72 °C durante 45 s e por fim, a etapa de amplificação final a 72 °C durante 10 min. De seguida, foi feita uma eletroforese em gel de agarose a 2 %, corada com GreenSafe Premium NZYtech™, para validação dos resultados do PCR.

Posteriormente os produtos de PCR obtidos foram purificados usando o Kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up da Macherey-Nagel® e enviados para sequenciação através do método de Sanger, para a empresa STAB VIDA®, Portugal. Estes produtos de amplificação foram sequenciados através de um aparelho de análise genética ABI 3730 Genetic Analyser, com o Kit Big Dye v.3 Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, California, USA). As sequências obtidas foram analisadas e editadas através do programa Geneious® software, sendo aquelas com uma qualidade inferior a 90 % descartadas da análise. A ferramenta “BLAST” (Basic Local Alignment Search Tool), disponível na plataforma do NCBI (National Center for Biotechnology Information), foi utilizada para confirmar a identidade taxonómica de cada espécie. A identificação das espécies foi validada usando apenas as sequências com pelo menos 97 % de similaridade entre as disponíveis na base de dados.

### **2.1.3. Caracterização morfológica e anatómica das ectomicorrizas de *Hydnum repandum***

A caracterização foi efetuada segundo Agerer e Rambold [109]; as micorrizas foram observadas à lupa e registou-se: a morfologia do sistema ectomicorrízico (comprimento da micorriza, tipo de ramificação presente, ordem de ramificação, diâmetro do eixo principal e presença de rizomorfos) e morfologia das extremidades não ramificadas (forma, forma da extremidade distal, comprimento, diâmetro, cor, cor da ponta, cor das extremidades mais antigas, visibilidade do manto; transparência do manto, presença de laticíferos no manto, presença de látex, cor das manchas do manto, cobertura da superfície do manto, tipo de superfície do manto. Presença de hifas emergentes e se presentes, abundância e distribuição dessas hifas).

Para a realização de cortes anatómicos, testaram-se dois protocolos: impregnação em parafina e em resina.

No primeiro, fixaram-se as ectomicorrizas numa solução aquosa de lacto-glicerina (1:1:1) e de seguida desidrataram-se e impregnaram-se com parafina líquida seguindo os seguintes passos: etanol 70 % - 120 min; etanol 70 % - 120 min; etanol 90 % - 90 min; etanol 90 % - 90 min; etanol 95 % - 90 min; etanol 100 % - 90 min; etanol 100 % - 90 min; Bio clear 90 min; Bio clear - 90 min; Bio clear - 90 min; parafina a 60 °C - 120 min; parafina a 60 °C - 120 min [110]. Incluíram-se as amostras em blocos de parafina (Fig. 2.2), seccionaram-se com um micrótopo (7-9 µm de espessura) e coraram-se com azul de toluidina (0.1 %) [111], para posterior observação.

O método de impregnação em resina iniciou-se com a fixação das micorrizas em glutaraldeído a 2.5 % em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.2, durante 180 minutos.



Figura 2.2: Blocos resultantes dos dois métodos de impregnação: parafina (A); resina - pormenor do alinhamento das micorrizas e da superfície convexa (B)

Posteriormente, submeteu-se o material a 3 lavagens de 15 minutos cada, no mesmo tampão. Omitiu-se a etapa da pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1 %, uma vez que não iriam ser feitos cortes ultrafinos para microscopia eletrónica. De seguida, procedeu-se à desidratação e impregnação em resina do material, realizando os seguintes

passos: etanol 70 % - 15 min; etanol 80 % - 15 min; etanol 90 % - 15 min; etanol 95 % - 15 min; etanol 100 % - 15 min; etanol 100 % - 15 min; etanol 100 % + resina (2:1) - 120 min; etanol 100 % + resina (1:1) - 120 min; etanol 100 % + resina (1:2) - 120 min; resina - 720 min. A resina foi colocada nos moldes, perfazendo 2/3 do total, e em seguida colocaram-se as amostras de ectomicorrizas na resina. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, o material foi devidamente orientado e encostado longitudinalmente ao fundo e ao topo da extremidade do poço e foram retiradas todas as bolhas de ar. O restante espaço de cada poço foi preenchido com resina, de modo a que formasse uma superfície convexa (Fig. 2.2). Deixaram-se os moldes numa estufa a 70 °C durante 24 horas. Com os blocos resultantes deste processo, fizeram-se cortes semi-finos (1-2 µm) com facas de vidro no micrómetro Ultrotome Nova. Colocaram-se os cortes sobre uma gota de água destilada numa lâmina de vidro e deixaram-se a secar. Posteriormente coraram-se com uma solução de azul de toluidina 1 % durante 20 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, lavaram-se as lâminas com água destilada, para retirar o excesso de corante.

Observaram-se e fotografaram-se os cortes, de ambas as impregnações (parafina e resina), num microscópio Leica DM 4000 B, usando o programa LAS v4.0. Foi dada especial atenção à observação do manto e rede de Hartig.

## **2.2. Síntese micorrízica *in vitro*: *Eucalyptus globulus* e diversos fungos ectomicorrízicos comestíveis**

### **2.2.1. Material Vegetal**

Para obter plântulas de *Eucalyptus globulus* – potencial parceiro vegetal para a síntese de ectomicorrizas *in vitro* – procedeu-se à germinação de sementes (Fig. 2.4), colhidas numa plantação de eucaliptos na localidade de Agrelo, Penacova, a vinte e um de novembro de 2017 (40°16'46.8"N 8°21'18.3"W). Foram ensaiados vários protocolos de esterilização e de germinação de sementes, com o objetivo de obter uma elevada percentagem de germinação e uma reduzida percentagem de contaminação das plântulas recém-formadas. Todas as sementes foram meticolosamente inspecionadas e

selecionadas à lupa, com o propósito de formar grupos de sementes o mais homogêneas possível.

Para o primeiro protocolo, colocaram-se 30 sementes num cilindro de plástico, com uma rede num dos lados, sendo sucessivamente mergulhado em gobelés com: hipoclorito de sódio (3 %); água destilada esterilizada; hipoclorito de sódio (3 %); água destilada esterilizada (Fig. 2.3). O tempo de mergulho das sementes no líquido de cada gobelé foi de 10 minutos. Em seguida, transferiram-se diretamente 15 sementes para caixas de Petri contendo meio Murashige and Skoog (MS) [112] a  $\frac{1}{2}$  + agar.

No segundo protocolo, colocaram-se 30 sementes num Eppendorf de 1.5 mL, juntamente com 1 mL de água destilada esterilizada. Em seguida mergulhou-se o tubo em banho-maria a 100 °C. Após 10 minutos, removeu-se o sobrenadante e efetuaram-se três lavagens sucessivas com água destilada esterilizada. Passaram-se as sementes para uma caixa de Petri esterilizada e plaquearam-se 15 sementes por placa de Petri contendo meio MS [112] a  $\frac{1}{2}$  + agar.

No terceiro protocolo, adicionaram-se num tubo de Eppendorf de 1.5 mL, 30 sementes juntamente com 1 mL de hipoclorito de sódio (3 %). O Eppendorf foi colocado num agitador Heraeus Biofuge Pico, à velocidade 10.0, durante 10 min. Posteriormente, removeu-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de água destilada esterilizada. Em seguida agitou-se o preparado num vortex Micro-spin FV2400 BioSan, a 2800 rpm, durante 5 s. Efetuaram-se várias lavagens, repetindo este último passo mais 5 vezes, usando sempre 1 mL de água destilada esterilizada. No final, retirou-se o sobrenadante, adicionou-se 1 mL de água destilada esterilizada e fechou-se o tubo de Eppendorf.

No quarto protocolo todos os passos foram iguais aos do terceiro já descritos, com exceção do último passo em que, em vez de adicionar 1 mL de água destilada esterilizada e se fechar o tubo de Eppendorf, passaram-se as sementes para uma caixa de Petri esterilizada e plaquearam-se 15 sementes em placas de Petri contendo meio MS [112] a  $\frac{1}{2}$  + agar.

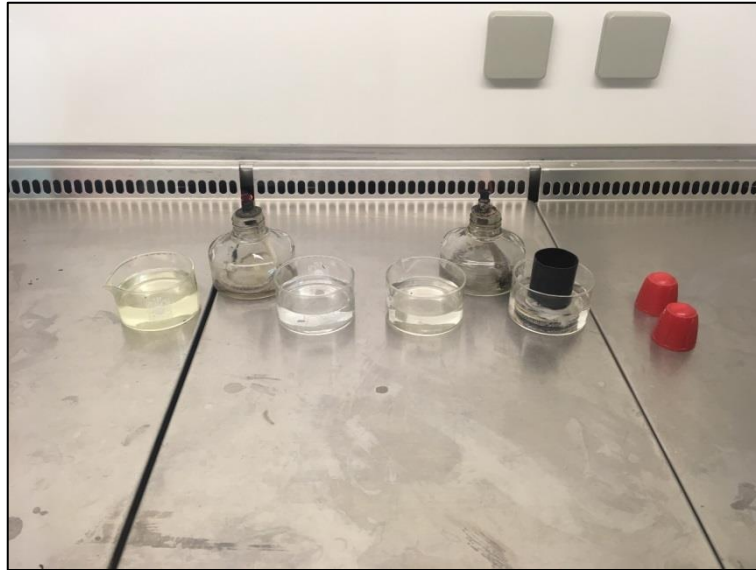


Figura 2.3: Material utilizado no protocolo 1 - na câmara de fluxo laminar

Para induzir a germinação das sementes, as placas de Petri (1º, 2º e 4º protocolos) e os tubos de Eppendorf de 1.5 mL (3º protocolo) foram envolvidas com folha de alumínio e colocadas durante 4 dias no frigorífico, a 4 °C. Ao fim deste tempo, passaram-se as sementes provenientes do 3º protocolo para uma caixa de Petri esterilizada e plaquearam-se em caixas de Petri, 15 por placa, contendo meio MS [112] a ½ + agar. Em seguida, transferiram-se todas as caixas de Petri para a estufa de crescimento, onde permaneceram durante 10 dias a 20 °C ± 1, sob luz fluorescente (150 µmol s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> [400-700 nm], 16 h/dia).

Ao fim desse tempo, foi registado o número total de sementes germinadas e contaminadas. Considerou-se que uma semente tinha germinado quando a radícula e os cotilédones se encontravam visíveis [113]. Compararam-se as percentagens de germinação e de contaminação e escolheu-se o melhor protocolo a usar para a produção de plântulas para a síntese de ectomicorrizas *in vitro*.

### 2.2.2. Material Fúngico

Para os ensaios de síntese de ectomicorrizas *in vitro* usaram-se seis espécies de fungos ectomicorrízicos comestíveis: *Boletus edulis*, *B. fragrans*, *Hydnum repandum*, *Lactarius deliciosus*, *Tricholoma equestre*, *T. portentosum*, cujos géneros foram relatados

como potenciais simbiontes naturais de *Eucalyptus globulus* [102] e uma espécie de fungo ectomicorrízico, não comestível, *Pisolithus tinctorius*, que se sabe ser um parceiro fúngico natural de eucaliptos (Fig. 2.4) [114], [115]. Os corpos frutíferos das espécies *B. edulis*, *H. repandum* e *P. tinctorius* foram colhidos entre outubro de 2017 e janeiro de 2018. O primeiro sob um exemplar de *Quercus robur*, o segundo e o terceiro sob *E. globulus* [78] (Tab. 2.1). As restantes espécies fúngicas supracitadas encontravam-se disponíveis na coleção do laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Estas culturas são mantidas em meio líquido Biotin-Aneurin-Folic Acid (BAF) [116], a 4 °C.



Figura 2.4: Material fúngico e vegetal usado no presente estudo. Corpos frutíferos de *Boletus edulis* (A), *Boletus fragrans* (B), *Tricholoma portentosum* (<http://mykoweb.com>) (C), *Tricholoma equestre* (<http://mykoweb.com>) (D), *Hydnum repandum* (E), *Lactarius deliciosus* (<http://mykoweb.com>) (F) e *Pisolithus tinctorius* (H). *Eucalyptus globulus* (G) e cápsulas com as sementes a negro (I)

Para o isolamento em cultura pura esterilizaram-se superficialmente os corpos frutíferos das espécies *B. edulis*, *H. repandum* e *P. tinctorius* com hipoclorito de sódio (3 %)



e seccionaram-se longitudinalmente em ambiente estéril, numa câmara de fluxo laminar. Com um bisturi esterilizado, retiraram-se porções da parte interna do pé, que foram colocadas em caixas de Petri com meio Potato Dextrose Agar (PDA) (Difco™), a pH 5.8-6.3. Estas caixas foram colocadas numa estufa a 24 °C, no escuro. A temperatura de 24 °C encontra-se entre os valores mais favoráveis para o crescimento da maioria dos fungos ectomicorrízicos [117], [118].

Para além do método anteriormente referido, a espécie *H. repandum* foi também alvo de tentativa de isolamento através de ectomicorrizas colhidas no solo (subtópico 2.2.1). Assim, ectomicorrizas previamente colhidas e morfológicamente identificadas como pertencentes a *H. repandum* foram removidas dos Eppendorfs, lavadas com água e observadas à lupa para seleção de ectomicorrizas aparentemente em bom estado (túrgidas e de cor clara). Após a remoção dos últimos detritos à sua volta, esterilizaram-se por imersão numa solução de hipoclorito de sódio (3 %), durante 8 min. Posteriormente, as ectomicorrizas foram inoculadas em caixas de Petri com meio PDA (Difco™), a pH 5.8-6.3. Estas placas foram em seguida colocadas a crescer numa estufa a 24 °C, no escuro.

As culturas puras que se encontravam na coleção do laboratório (*B. fragrans*, *L. deliciosus*, *T. equestre* e *T. portentosum*) foram repicadas através da colocação de três explantes quadrangulares com 0.25 cm<sup>2</sup> para caixas de Petri com meio PDA (Difco™), a pH 5.8-6.3. Estas caixas foram em seguida colocadas a crescer numa estufa a 24 °C, no escuro.

Tanto as culturas isoladas a partir dos corpos frutíferos, como através de ectomicorrizas colhidas no solo e as repicadas de culturas puras da coleção do laboratório foram monitorizadas com regularidade, para avaliar o sucesso dos isolamentos e para eliminar contaminações, até se obterem culturas puras e desenvolvidas.

O aumento de escala destas espécies foi feito com recurso a culturas em meio líquido, tendo em vista a produção de inóculo fúngico para os ensaios de micorrização. Utilizaram-se balões de Erlenmeyer de 50 mL, com 30 mL de meio líquido BAF [116] esterilizado, a pH 5.8 (acertado com adição de HCl e KOH) (Fig. 2.5). Em cada balão foram colocados três explantes quadrangulares com 0.25 cm<sup>2</sup> das culturas puras de *L. deliciosus*, de *P. tinctorius*, de *T. equestre* e de *T. portentosum*. Diversos trabalhos descreveram o

meio BAF [116] como tendo proporcionado bons resultados no crescimento e aumento da densidade do micélio dos fungos em estudo [68], [119].

Para cada espécie fúngica foram utilizados 10 balões. Cada balão foi fechado com Parafilme e novamente revestido com folha de alumínio, a fim de evitar, possíveis contaminações. Todos os balões foram colocados numa estufa a 24 °C, no escuro. Na ausência de um agitador orbital, cada cultura foi sujeita a agitação manual durante 20 segundos, de 3 em 3 dias.

### **2.2.3. Identificação molecular das culturas puras**

Identificaram-se molecularmente todas as espécies isoladas em cultura pura através da sequenciação da região ITS (rADN). Para tal, extraiu-se o ADN com REExtract-N-Amp™ (SIGMA-ALDRICH® Company), utilizando 1 mm<sup>2</sup> de cultura de micélio puro em 10 µL de solução extrato e submetendo a 94 °C por 10 min, 60 °C por 13 min e por fim a 10 °C por 15 min. Seguidamente, adicionou-se um volume igual da solução de diluição. Realizou-se o PCR utilizando o par de primers ITS1-F / ITS4 e o REExtract-N-Amp PCR ReadyMix™ (SIGMA-ALDRICH® Company) com os seguintes parâmetros no termociclador: 95 °C durante 5 min (desnaturação inicial), 35 ciclos a 95°C durante 45 s, 57 °C durante 45 s e 72 °C durante 45 s e por fim a etapa da amplificação final a 72 °C durante 10 min. Fez-se uma eletroforese em gel com 2 % de agarose para validar a amplificação. Posteriormente as bandas únicas obtidas na reação de PCR foram purificadas usando o kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up da Macherey-Nagel® e enviadas para sequenciar através do método de Sanger para a empresa STAB VIDA®, Portugal. As sequências obtidas foram analisadas e editadas através do programa Geneious® software. A qualidade das sequências foi analisada e as sequências com uma qualidade inferior a 90 % foram descartadas da análise. A ferramenta “BLAST” (Basic Local Alignment Search Tool) disponível na plataforma do NCBI (National Center for Biotechnology Information) foi utilizada para confirmar a identidade taxonómica de cada espécie. Foram consideradas como sendo da mesma espécie sequências que apresentavam a partir de 97% de similaridade com as sequências disponíveis na base de dados.

Tabela 2.1: Fungos ectomicorrízicos usados neste estudo, proveniência, habitat, data de colheita, sucesso no isolamento e código de coleção

Espécies	<i>Boletus edulis</i>	<i>Boletus fragrans</i>	<i>Hydnum repandum</i>	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pisolithus tinctorius</i>	<i>Tricholoma equestre</i>	<i>Tricholoma portentosum</i>
Origem	São Pedro do Sul, Viseu, Portugal	Ameal, Coimbra, Portugal	Brasfemes, Coimbra, Portugal	Cantanhede, Coimbra, Portugal	Coimbra, Portugal	Cantanhede, Coimbra, Portugal	Aquisição Comercial
Coordenadas	40°44'21.9"N 8°03'59.9"W	40°11'08.5"N 8°32'45.3"W	40°16'25.5"N 8°23'18.7"W	40°21'01.9"N 8°41'39.7"W	40°12'28.1"N 8°22'34.7"W	40°21'01.9"N 8°41'39.7"W	40°10'48.9"N 7°39'40.1"W
Habitat	Quercus sp.	<i>Q. faginea</i> / <i>Q. robur</i>	<i>Eglobulus</i>	<i>P. pinaster</i> / <i>Cistus</i> spp.	<i>E. globulus</i>	<i>P. pinaster</i> / <i>Cistus</i> spp.	<i>P. pinaster</i> / <i>Cistus</i> spp.
Data de Colheita	out-17	nov-14	jan-18	out-14	nov-17	out-14	out-14
Sucesso no Isolamento	X	X	X	✓	✓	✓	✓
Código de Coleção	—	BF.06.11/14-AML	—	LD.03.10/14.CANTNH	PT.07.11/17.CBR	TE.04.10/14.CANTNH	TP.05.10/14.PL

#### **2.2.4. Otimização das condições de crescimento de *Eucalyptus globulus***

Utilizaram-se diversos substratos (composição e percentagens) para testar o crescimento das plântulas em recipientes com tampa com filtro HEPA (volume = 1 L, altura = 14 cm e diâmetro da base = 8,5 cm). Testaram-se duas composições de substratos (perlite + turfa 1:1; perlite + turfa + areão de rio lavado 4:2:1), três volumes de substrato/recipiente (100 mL, 200 mL e 300 mL) e sete volumes de meio de cultura/recipiente (60 mL, 80 mL, 100 mL, 120 mL, 140 mL). O meio de cultura foi o meio MS [112] com a receita diluída a  $\frac{1}{2}$  da original. Este meio foi inicialmente criado para culturas de células de plantas *in vitro*, contudo também tem sido usado para o crescimento de fungos em alguns estudos [68], [120], [121]. A receita de MS [112] diluída a  $\frac{1}{2}$  da original aumenta a formação do número de raízes em relação à receita original [122]. Elevadas concentrações de nutrientes, nomeadamente potássio e azoto, presentes neste meio poderão inibir a formação de micorrizas [123].

Antes da colocação das plântulas nos recipientes estes foram esterilizados duas vezes na autoclave a 121 °C, durante 20 min. Avaliou-se a sobrevivência das plantas todas as semanas, durante dois meses e ao fim desse período, avaliou-se o crescimento e *fitness* das plantas (altura, firmeza e desenvolvimento radicular e aéreo). Com base nos resultados obtidos identificou-se as melhores condições de cultura, que foram usadas para a síntese de ectomicorrizas no presente estudo.

#### **2.2.5. Síntese de ectomicorrizas**

Para a síntese de ectomicorrizas, as plântulas de *E. globulus* germinadas nas caixas de Petri foram transplantadas para recipientes que continham 200 mL de perlite + turfa + areão de rio lavado (4:2:1) e 100 mL de meio MS [112] com a receita diluída a  $\frac{1}{2}$  da original (n=10; 70 recipientes). Em cada recipiente foram colocadas três plântulas de *E. globulus*, com tamanhos semelhantes e em condições estéreis (Fig. 2.5). Estes recipientes foram colocados numa estufa de crescimento exterior, a temperatura média de 20 °C (Esta temperatura foi ultrapassada nos dias de maior calor).

Vinte e um dias após o transplante, retiraram-se, de cada recipiente, as duas plantas visualmente mais díspares em termos de tamanho médio, ficando uma única planta saudável por recipiente. Em seguida, procedeu-se à inoculação dos fungos micorrízicos nos recipientes já só com uma única planta, tendo sido utilizados três métodos distintos na inoculação.

No primeiro método utilizou-se como inóculo as culturas de micélio em meio líquido das espécies micorrízicas comestíveis *L. deliciosus*, *T. equestre*, *T. portentosum* e da espécie micorrízica não comestível *P. tinctorius*, utilizada como controlo positivo. Como controlo negativo procedeu-se apenas à adição de meio líquido BAF [116].

Para cada inoculação foi feito um buraco no substrato, com uma pinça esterilizada, ao lado da planta remanescente e inoculou-se todo o conteúdo dos balões de Erlenmeyer de 50 mL, com e sem fungos. Todo este procedimento foi realizado numa câmara de fluxo laminar para evitar contaminações.

No segundo método, para a inoculação da espécie *H. repandum* (da qual não foi possível obter culturas de micélio puras), utilizou-se uma mistura de esporos e fragmentos do himénio obtidos através da secagem de corpos frutíferos da espécie, previamente colhidos e desidratados [82]. A obtenção dos esporos foi feita colocando os corpos frutíferos de *H. repandum* em cima de uma folha de papel branca, com as agulhas do himénio viradas para baixo, numa estufa a 60 °C, durante 1 dia [41]. Os esporos obtidos foram de seguida misturados com fragmentos do himénio esfarelados. Em seguida juntou-se 750 mg desta mistura com 30 mL de meio líquido BAF [116] autoclavado. Agitou-se o preparado manualmente durante 20 segundos e em seguida procedeu-se à inoculação das plantas de *E. globulus*, respeitando os mesmos passos do primeiro método.

No terceiro método utilizaram-se *soil traps* [124]. Para cada inoculação adicionou-se aproximadamente 3 cm de altura de solo contendo raízes de *E. globulus* (amostras recolhidas aquando da colheita de micorrizas no subtópico **2.1.1**).

Todos os 70 recipientes com plantas de *E. globulus* e inoculados com diferentes tipos de inóculo fúngico foram colocados, de forma aleatória, na estufa de crescimento exterior, a temperatura média de 20 °C (Fig. 2.5).



Figura 2.5: Balões de Erlenmeyer utilizados para o aumento de escala (A); *Eucalyptus globulus* 21 dias após terem sido transferidas para dentro dos recipientes (B); Recipientes distribuídos de forma aleatória dentro da estufa de crescimento (C)

### 2.2.6. Avaliação das plantas de *Eucalyptus globulus*

A primeira avaliação das plantas de *E. globulus* foi feita na data do transplante das plântulas das caixas de Petri (plântulas com 10 dias), para dentro dos recipientes de cultura. Utilizaram-se 10 plântulas excedentes, com graus de desenvolvimento semelhantes aos das plântulas transplantadas e mediu-se o comprimento da parte radicular, da parte aérea, o número de folhas verdes e o peso total.

A segunda avaliação ocorreu no dia da inoculação fúngica dos recipientes (21 dias após o transplante), utilizando igualmente 10 plantas excedentes, com graus de desenvolvimento semelhantes ao das inoculadas, tendo sido registados os mesmos

parâmetros da primeira avaliação.

A terceira avaliação foi efetuada ao fim de 4 meses e 21 dias após o primeiro registo. Retiraram-se as plantas de dentro dos recipientes (n=10 por tratamento), colocaram-se as raízes em água e detergente Tween 20, durante 30 minutos, e passaram-se novamente por água para remover o substrato aderente à volta das raízes. Em seguida procedeu-se ao registo dos parâmetros de crescimento (medidos nas duas avaliações anteriores), bem como do peso da parte aérea e da parte radicular de cada uma das plantas.

### **2.2.7. Colonização micorrízica**

Para avaliar a colonização micorrízica analisou-se, no momento da terceira avaliação, o sistema radicular de cada planta, utilizando uma escala quantitativa para determinar a percentagem de micorrização (0-10 %; 11-20 %; 21-30 %; >31 %). As (putativas) pontas micorrizadas foram caracterizadas morfológicamente, fotografadas e, por último, foram guardadas em tubos Eppendorf de 1.5 mL, com 1 mL de álcool a 96 %, a -20 °C, com vista a uma futura confirmação molecular da identidade do simbionte fúngico e caracterização anatómica das micorrizas.

## **2.3. Otimização das condições de crescimento de micélio e tentativa de frutificação de *Macrolepiota procera***

### **2.3.1. Material Fúngico**

Para este estudo usou-se um corpo frutífero da espécie *Macrolepiota procera* colhido a 14 de Dezembro de 2017, nas coordenadas geográficas 40°12'36.8"N 8°24'20.6", Quinta de São Jerónimo, Coimbra (Fig. 2.6.).



Figura 2.6: Corpo frutífero de *Macrolepiota procera*

O solo, com pH 7.01, encontrava-se parcialmente coberto por gramíneas e com folhada (camada com cerca de 5 cm) de *Quercus suber* e de *Pinus pinaster*, as duas espécies presentes num raio de 6 metros à volta do cogumelo. No campo, a identificação do corpo frutífero desta espécie baseou-se na morfologia [50]. No laboratório o método utilizado para o isolamento de culturas puras a partir do corpo frutífero, em caixas de Petri com meio PDA (Difco<sup>TM</sup>), foi semelhante ao método já descrito no subtópico **2.2.2**.

Para a confirmação molecular das culturas de micélio, foi utilizado um método semelhante ao método descrito anteriormente, no subtópico **2.2.3**.

### **2.3.2. Otimização da produção de “semente” (*Spawn*)**

O aumento de escala das culturas puras de *M. procera* realizou-se em duas etapas.

Na primeira, recorreu-se a um método similar ao já descrito anteriormente para o aumento de escala das culturas de micélio de fungos micorrízicos no subtópico **2.2.2**. Com base no trabalho de Shim *et al.* [56], que refere o valor de pH 7 e temperatura de



30 °C como os mais adequados ao crescimento do micélio, corrigiu-se o pH do meio líquido BAF [116] para pH 7.0 (acertado com adição de HCL e KOH) e aumentou-se a temperatura da estufa de crescimento de 24 °C para 30 °C. Todas as restantes etapas foram semelhantes, incluindo o passo da agitação manual durante 20 segundos, de 3 em 3 dias, procedimento também descrito como importante para o crescimento do micélio em culturas submersas [57].

Numa segunda etapa, ensaiaram-se 3 misturas de substratos de aveia e trigo (100 % aveia; 100 % trigo; 70 % aveia + 30 % trigo). Adicionou-se 0,5 % de carbonato de cálcio e 1 % de gesso em pó, a todas as misturas, para aumentar o pH. Para preparar estas misturas pesaram-se os cereais, lavaram-se em água corrente e colocaram-se em água a ferver durante 15 min. Ao fim deste tempo, escoou-se a água em excesso, colocaram-se os cereais em recipientes (n=5), perfazendo cerca de 80 % da sua capacidade total, adicionou-se a cada um o carbonato de cálcio e o gesso e, depois de fechados, foram autoclavados a 121 °C, durante 20 min. Após arrefecimento, verteu-se, de maneira homogénea e sobre a superfície do substrato, o inóculo fúngico contido nos balões de Erlenmeyer (1 balão por recipiente) (Fig. 2.7). Os recipientes foram mantidos numa estufa a 30 °C, no escuro. Utilizaram-se recipientes com uma tampa com filtro HEPA, idênticos aos do crescimento das plântulas no subtópico **2.2.4**. Os 20 % de espaço livre deixado dentro dos recipientes, teve como função permitir as trocas gasosas necessárias ao desenvolvimento do fungo (Fig. 2.7). Este ensaio contou com 5 réplicas por cada mistura e procedeu-se à observação regular dos recipientes para avaliar a progressão da colonização do substrato, tendo-se contabilizado o número de dias, desde a inoculação até ao dia em que se registou a colonização total do substrato pelo micélio de *M. procer* (quando todos os grãos de cereal visíveis se encontravam colonizados). No decorrer da experiência foi definido um prazo máximo de 30 dias para avaliar a colonização do substrato, devido às discrepâncias da colonização das diferentes misturas ensaiadas.

Ao fim deste período de tempo compararam-se os resultados obtidos e selecionou-se a melhor mistura para o aumento de escala da *spawn*.

### 2.3.3. Substratos para a produção de cogumelos de *Macrolepiota procera*

A escolha da composição dos substratos para produção de cogumelos de *M. procera* teve em consideração as características do solo onde os corpos frutíferos foram colhidos e uma mistura para produção de cogumelos *Agaricus bisporus* já descrita na bibliografia (palha de trigo e estrume de cavalo 1:1).

Adquiriu-se estrume de cavalo (Siro Agro 2, pH 7.8) e palha de trigo. Procedeu-se à recolha de folhas de carvalho (*Quercus faginea*) e palha de arroz (um resíduo agrícola da cultura de arroz do Baixo Mondego, Coimbra). A palha de arroz tem sido usada em vários estudos com outros fungos saprófitas comestíveis, como *Pleurotus ostreatus* e *Agaricus bisporus* [125]–[129].

Como contentor para o embalamento dos substratos utilizaram-se: i) recipientes com tampa com filtro HEPA (400 g de mistura por recipiente) e ii) sacos de autoclave (5 kg por saco), fechados com uma rolha de algodão encimada com uma folha de alumínio (Fig. 2.7). A rolha de algodão, tal como o filtro HEPA na tampa dos recipientes, permitiram as trocas gasosas evitando o risco de entrada de contaminantes; a folha de alumínio foi usada para impedir a entrada de água durante a esterilização, tendo sido retirada no final desse processo.

Para este ensaio prepararam-se três substratos de produção diferentes com pesos iguais (1:1) de folhas de carvalho + estrume de cavalo; palha de trigo + estrume de cavalo; e palha de arroz + estrume de cavalo.

Para o primeiro substrato cozeram-se as folhas de carvalho durante 10 min em água a ferver, escoou-se a água e misturou-se com partes iguais de estrume de cavalo humedecido. Homogeneizou-se a mistura obtida, mediu-se o pH (6.91), encheram-se 10 recipientes e 10 sacos de autoclave e procedeu-se à sua esterilização na autoclave a 121 °C, durante 120 min.

Para o segundo substrato pesou-se e misturou-se partes iguais de palha de trigo e estrume de cavalo para dentro de um saco preto, homogeneizou-se e adicionou-se água até humedecer bem a mistura obtida, deixando-se a compostar durante duas semanas num local escuro e fresco, com o saco totalmente fechado. Ao fim deste tempo escoou-

se a água da mistura e mediu-se o pH (6.12). Em seguida encheram-se 10 recipientes e 10 sacos, adicionou-se a cada um 0,5 % de carbonato de cálcio e 1 % de gesso em pó, para aumentar o pH e procedeu-se à sua esterilização em autoclave comercial durante 120 min, a 121 °C.

Para o terceiro substrato o método utilizado foi semelhante ao do segundo substrato, porém em vez de se utilizar palha de trigo utilizou-se palha de arroz. Essa mistura apresentava um pH de 6.08.

Após arrefecimento dos substratos, cada recipiente foi inoculado à superfície com 3 cm de altura de *spawn* enquanto que cada saco foi inoculado com o conteúdo de um recipiente de *spawn*, misturado de maneira homogênea (Fig. 2.7). No final, recipientes e sacos foram colocados a crescer numa estufa a 30 °C, durante 40 dias, no escuro.

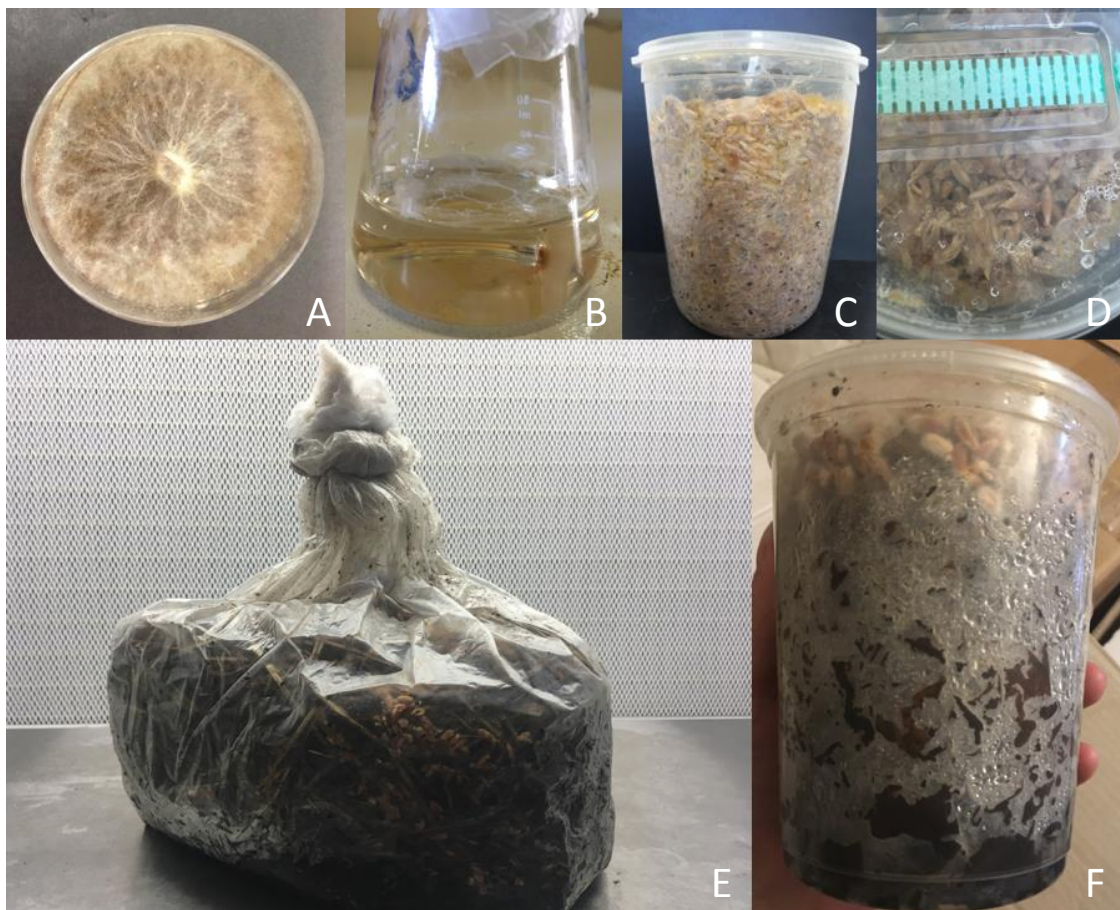


Figura 2.7: Etapas desde o crescimento do micélio em caixas de Petri (A), passando por aumento de escala: em cultura líquida (B) e numa mistura 70 % aveia + 30 % trigo (C e D); até à inoculação em sacos de autoclave (E) e recipientes com tampa com filtro HEPA (F)

#### **2.3.4. Tentativa de indução da formação de corpos frutíferos**

Após o crescimento em estufa do fungo nos contentores (recipientes e sacos), estes foram transferidos para uma sala de cultivo a 30 °C. Em seguida aplicou-se 3-5 cm de 5 misturas (receitas) diferentes de terra de cobertura, previamente humedecidas com água, aos 10 recipientes e 10 sacos de cada substrato.

A primeira receita de terra de cobertura foi feita com manta morta (sem tratamento) do local onde foi colhido o corpo frutífero e água.

A segunda igual à primeira, mas pasteurizada a 63 °C, durante 30 min.

A terceira igual à primeira, mas esterilizada a 121 °C, durante 20 min.

A quarta receita foi feita com turfa + gesso (9:1).

A quinta continha turfa + gesso + carvão ativado (9:1:1).

Nas duas últimas receitas homogeneizaram-se os ingredientes sólidos, obtendo-se uma mistura. Separou-se 1/5 desta mistura, saturou-se de água os restantes 4/5 e, por fim, misturou-se o 1/5 que estava seco aos 4/5 saturados de água.

O objetivo final, para as 5 receitas, foi obter uma terra de cobertura que quando espremida com a mão libertasse 2 a 3 gotas de água no máximo.

Uma vez que não se conseguiu monitorizar a humidade na sala de cultivo, fizeram-se 5 a 6 regas diárias, com recurso a um aspersor, de forma a manter-se a humidade à superfície da terra de cobertura alta, tendo sempre o cuidado de não ensopar.

Quando as hifas do micélio se tornaram visíveis à superfície da terra de cobertura procedeu-se à tentativa de indução de formação de corpos frutíferos, através da aplicação de diferentes estímulos. Efetuaram-se 2 tratamentos, aplicados tanto aos recipientes como aos sacos (50 % por tratamento).

No primeiro tratamento mantiveram-se os contentores na sala de cultivo onde se aumentou a ventilação, desceu-se a temperatura para 20 °C e expôs-se a luz indireta durante 8 horas por dia (Tab. 3.6). A humidade foi mantida a níveis muito elevados recorrendo à cobertura do material em teste com uma folha de papel absorvente humedecida com 2 a 3 regas diárias, por aspersão.

No segundo tratamento aplicou-se um estímulo de frio, através da colocação dos

contentores no frigorífico a 4 °C, durante 5 dias, com uma única rega diária, por aspersão (Tab. 3.7). Ao fim deste estímulo de frio, estes contentores foram colocados junto dos restantes na sala de cultivo, ficando sujeitos às mesmas condições.

Durante este ensaio, e apesar das precauções tomadas, foi necessário proceder, pontualmente, à eliminação química de pragas de insetos.

### **2.3.5. Inoculação e observação do crescimento de corpos frutíferos de *Macrolepiota procera* na natureza**

Como o objetivo desta experiência era avaliar a viabilidade de inocular a espécie *Macrolepiota procera* na natureza, a área escolhida para a realização deste teste foi um local que dista cerca de 510 m de distância do local de colheita do cogumelo de *M. procera* utilizado para a obtenção do inóculo de micélio, nas coordenadas geográficas 40°12'53.1"N 8°24'16.8"W (Fig. 2.8). O solo, com pH 6.73, encontrava-se parcialmente coberto por gramíneas e com folhada (camada com cerca de 5 cm) de *Q. robur* presente nas imediações. Não se tendo observado frutificações de *M. procera* nas proximidades, admitiu-se a inexistência do fungo nessa área em particular.

O método escolhido para a inoculação deste fungo foi o descrito por Paul Stamets [130]. No final do mês de Setembro de 2018, fizeram-se três buracos quadrangulares no solo com cerca de 10 cm de profundidade e 45 cm de largura, verteu-se de maneira homogénea 400 gramas de *spawn* em cada buraco e cobriu-se com uma fina camada de folhas de carvalho. Entre cada local de inoculação foi mantida a distância aproximada de 1 m. Os locais de inoculação foram marcados e foram feitas observações semanais destes locais, com o objetivo de registar o aparecimento e o número de corpos frutíferos de *M. procera*.



Figura 2.8: Local da inoculação de *Macrolepiota procera* na natureza (A); Distância entre o local de colheita do cogumelo *Macrolepiota procera* e o local da inoculação (B) (<https://www.google.com/maps>)

## Capítulo 3 - Resultados

### 3.1. Caracterização das ectomicorrizas de *Eucalyptus globulus* + *Hydnum repandum* colhidas em condições naturais

#### 3.1.1. Análise molecular das micorrizas

De entre os quatro morfotipos de micorrizas analisados molecularmente foi inicialmente confirmada a identidade da espécie *Hydnum repandum* através de uma eletroforese em gel de agarose, comparando o tamanho das bandas do produto de PCR que foram obtidas tanto usando o ADN dos diferentes morfotipos de micorrizas como o ADN do corpo frutífero de *H. repandum* colhido no mesmo local, como *template* da reação (Fig. 3.1). A análise molecular confirmou a identidade dos morfotipos (Tab. 3.1).

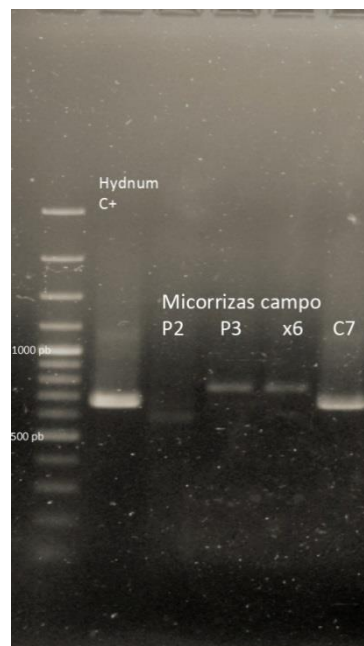


Figura 3.1: Bandas resultantes da eletroforese em gel de agarose de diferentes morfotipos de micorrizas e do template da reação. *Rhizodermea veluwensis* (P2); *Descolea maculata* (P3 e X6); *Hydnum repandum* (C7)

Tabela 3.1: Detalhes da análise molecular aos diferentes morfotipos

Morfotipo	Espécie	Referência GenBank	Valores de cobertura (%)	Valores de similaridade (%)
P3	<i>Descolea maculata</i>	DQ192181.1	98	99
X6	<i>Descolea maculata</i>	DQ192181.1	100	99
C7	<i>Hydnum repandum</i>	AY817136.1	99	99
P2	<i>Rhizodermea veluwensis</i>	LC151458.1	93	99

### 3.1.2. Caracterização morfológica e anatômica das ectomicorrizas de *Hydnum repandum*

Com recurso à observação das micorrizas (Fig. 3.2) e aos cortes efetuados em parafina e em resina (Fig. 3.3), descreveu-se pela primeira vez, segundo as normas de Agerer e Rambold [109], a associação entre as espécies *H. repandum* e *Eucalyptus globulus* na natureza.

Morfologia do sistema ectomicorrízico: com 4-5.8 mm de comprimento, com sistema de ramificação monopodial-piramidal, ordem de ramificação 0-1, com 0.23-0.3 mm de diâmetro do eixo principal. Rizomorfos não observados.

Morfologia das extremidades não ramificadas: dobradas, com a extremidade distal não inflada e cilíndrica, com 0-1 mm de comprimento, com 0.17-0.23 mm de diâmetro, cor laranja esbranquiçadas, pontas brancas, extremidades mais antigas laranjas; manto visível, não transparente, com laticíferos do manto ausentes, sem latex secretado do manto, com manchas do manto ausentes, superfície do manto brilhante, pouco lanosa. Hifas emergentes presentes, pouco frequentes, concentradas distalmente.

Anatomia do manto em secção transversal: hifas com um arranjo irregular e sem nenhum padrão especial discernível, com 25  $\mu\text{m}$  de diâmetro máximo. Rede de Hartig cortical.





Figura 3.2: Ectomicorriza da espécie *Hydnum repandum* em associação com *Eucalyptus globulus*. Barra = 10 mm

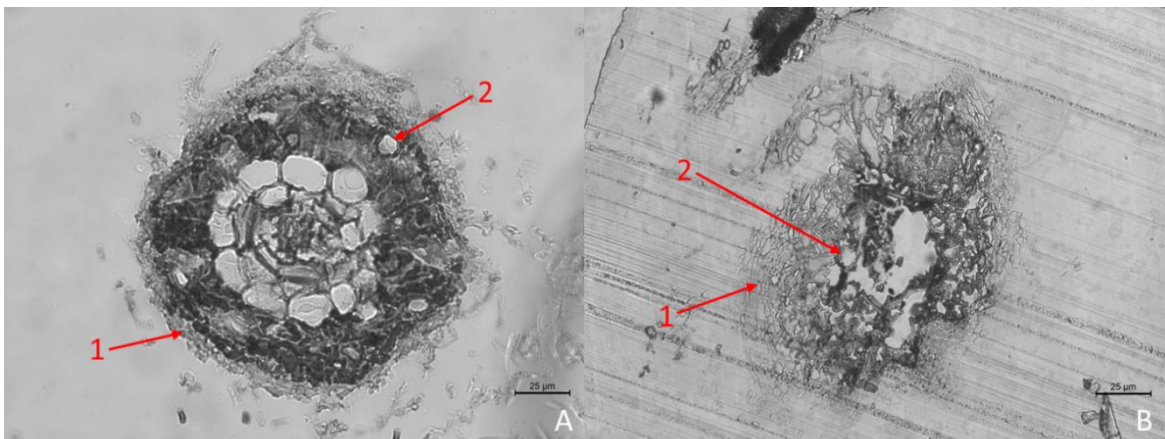


Figura 3.3: Cortes transversais das ectomicorrizas da espécie *Hydnum repandum* em associação com *Eucalyptus globulus* impregnadas em parafina (A) e resina (B). 1 – manto, 2 – rede de Hartig cortical

## 3.2. Síntese micorrízica *in vitro*: *Eucalyptus globulus* e diversos fungos ectomicorrízicos comestíveis

### 3.2.1. Isolamento das espécies fúngicas em cultura pura e aumento de escala

Das espécies fúngicas isoladas a partir dos corpos frutíferos apenas houve sucesso no isolamento da espécie *Piolithus tinctorius*. Nas caixas de Petri inoculadas com *Boletus edulis* não houve resposta por parte dos explantes. Nas que foram inoculadas com *Hydnum repandum* houve contaminação de todo o material isolado por bactérias, não havendo crescimento de hifas a partir dos explantes (Fig. 3.4).



Figura 3.4: Caixa de Petri com explantes de *Hydnum repandum* contaminados

Na tentativa de isolamento da espécie *H. repandum* a partir de ectomicorrizas colhidas sob o corpo frutífero não se obtiveram os resultados esperados, uma vez que junto dessas ectomicorrizas cresceu um micélio que à partida parecia ser do fungo isolado, mas após confirmação molecular, revelou ser de um fungo contaminante (*Epicoccum nigrum*).

Das culturas micelianas existentes na coleção do laboratório de Biologia Molecular, apenas a repicagem da espécie *Boletus fragrans* não apresentou crescimento de hifas a partir dos explantes quadrangulares de 0.25 cm<sup>2</sup>.

O aumento de escala, em meio líquido, das espécies isoladas com sucesso ocorreu sem qualquer percalço, tendo ocorrido um bom desenvolvimento de aglomerados de hifas, livres de contaminações, dentro dos balões de Erlenmeyer.

### 3.2.2. Confirmação molecular da identidade do material fúngico

Confirmou-se a identidade das culturas puras de micélio (*Eppicoccum nigrum*; *Lactarius deliciosus*, *Pisolithus tinctorius*, *Tricholoma equestre*, *T. portentosum*) e do corpo frutífero de *H. repandum* com recurso à análise molecular. Após a determinação da similaridade das sequências obtidas com as depositadas na base de dados Genbank, só se consideraram como sendo do mesmo taxon as sequências com similaridade acima de 97 %. Os números de acesso do GenBank com os quais as sequências mostraram uma máxima identidade, bem como os valores de cobertura e similaridade encontram-se na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Detalhes da análise molecular das culturas puras e do corpo frutífero de *Hydnum repandum*

Espécie	Referência GenBank	Valores de cobertura (%)	Valores de similaridade (%)
<i>Eppicoccum nigrum</i>	MF509753.1	99	99
<i>Hydnum repandum</i>	AY817136.1	100	100
<i>Lactarius deliciosus</i>	KJ769672.1	97	99
<i>Pisolithus tinctorius</i>	HE578142.1	100	100
<i>Tricholoma equestre</i>	EU186310.1	95	99
<i>Tricholoma portentosum</i>	EU186273.1	96	99

### 3.2.3. Efeito de diversos protocolos na esterilização e germinação de sementes de *Eucalyptus globulus*

Os protocolos aplicados na esterilização superficial das sementes de *Eucalyptus globulus* tiveram diferentes efeitos na percentagem de germinação e de contaminação. Em quase todos os protocolos de esterilização houve sementes

contaminadas, com exceção do protocolo 1. A percentagem máxima de germinação de sementes foi semelhante em quase todos os protocolos, variando entre 67 % no protocolo 3, 73 % nos protocolos 1 e 4 e 86 % no protocolo 2 (Tab. 3.3).

Após comparação dos resultados optou-se pelo protocolo 1 para a produção de plântulas para os ensaios de síntese de ectomicorizas.

Tabela 3.3: Número e percentagem de germinação e contaminação, nos quatro métodos utilizados, para esterilização superficial de sementes em *Eucalyptus globulus*

Protocolo	Germinação	Germinação (%)	Contaminação	Contaminação (%)
1	11	73	0	0
2	13	86	1	7
3	10	67	3	20
4	11	73	1	7

### 3.2.4. Efeito dos substratos no comportamento das plantas (Otimização das condições de crescimento de *Eucalyptus globulus*)

Face à capacidade e forma dos recipientes usados para o crescimento das plântulas de *E. globulus* após a germinação, foi decidido utilizar unicamente 200 mL de substrato por recipiente (Fig. 3.5).



Figura 3.5: Recipientes com os volumes de substrato 300 ml, 200 ml e 100 ml de Perlite + Turfa (1:1) (da esquerda para a direita)

No ensaio em que foi usada a composição de substrato perlite + turfa + areão de rio lavado (4:2:1) os recipientes aos quais se adicionou 120 mL e 140 mL de meio MS [112] (com a receita diluída a ½ da original) ficaram com excesso de água, impossibilitando a plantação das plântulas de *E. globulus* (Tab. 3.6). Nos recipientes que continham 60 mL de MS [112] as plantas secaram antes do final da experiência.

No ensaio realizado com o substrato perlite + turfa (1:1) a adição de 140 mL de MS [112] impossibilitou a plantação (tal como acontecera com o outro substrato). As plantas dos recipientes que continham 60 mL de meio MS [112] também acabaram por secar antes do final da experiência (Tab. 3.6).

Os melhores resultados foram obtidos com 200 mL do substrato perlite + turfa + areão de rio lavado (4:2:1) + 100 mL de MS [112] a ½, em que as plantas cresceram mais, com mais firmeza, e com uma boa colonização radicular do substrato.

Em todos os outros ensaios as plantas sobreviveram aos 2 meses da experiência apresentando em geral um bom desenvolvimento aéreo, associado a uma colonização homogênea das raízes no substrato.

As plantas de *E. globulus* que cresceram no substrato perlite + turfa + areão de rio lavado (4:2:1) aparentavam, em geral, maior firmeza ao choque em relação às que foram plantadas em perlite + turfa (1:1).

Tabela 3.4: Plantação e sobrevivência das plântulas de *Eucalyptus globulus* nos diferentes substratos e volumes de meio MS adicionado. “—” Não foi possível plantar as plântulas devido ao excesso de meio líquido; “⊖” As plantas não sobreviveram aos dois meses da experiência; “+” As plantas sobreviveram aos dois meses da experiência

Substrato (200 mL)	Volume meio MS (mL)	60	80	100	120	140
Perlite+turfa+areão de rio lavado (4:2:1)		⊖	+	+	—	—
Perlite+turfa (1:1)		⊖	+	+	+	—

### 3.2.5. Avaliação das Plantas de *Eucalyptus globulus* e da colonização micorrízica

Na primeira avaliação das plântulas de *E. globulus* (plântulas com 10 dias) estas apresentavam em média duas folhas verdes, um peso médio de 6.6 mg, comprimento médio da raiz de 0.49 cm e da parte aérea de 0.46 cm (Tab. Supl. 1).

Na segunda avaliação (21 dias após o transplante) as plantas apresentavam, em média, seis folhas verdes, um peso médio de 43.5 mg, comprimento médio da raiz de 3.24 cm e da parte aérea de 3.01 cm (Tab. Supl. 2).

Na terceira avaliação (4 meses e 21 dias após o transplante) as plantas de *E. globulus* encontravam-se com um bom desenvolvimento em geral, apresentando folhas bem desenvolvidas, com caules firmes e raízes que ocupavam homogeneamente o substrato. Aquando da abertura dos recipientes, foi notório um aroma característico a eucaliptol. As plantas foram removidas do substrato e as raízes cuidadosamente lavadas em água. Após observação das raízes das plantas à lupa binocular, não se observaram ectomicorrizas nas plantas de nenhum dos tratamentos. Como tal, apenas se apresentam os parâmetros de crescimento das plantas que serviram de controlo negativo. Estas, apresentavam em média 53 folhas verdes, peso da parte radicular de 1.811 g e peso da parte aérea de 1.487 g, o que perfazia um peso total médio de 3.298 g. O comprimento médio da parte radicular era de 14 cm e da parte aérea era de 14.3 cm (Tab. Supl. 3).

### **3.3. Otimização das condições de crescimento de micélio e tentativa de frutificação de *Macrolepiota procera***

#### **3.3.1. Crescimento e otimização da *spawn***

Ao fim de 21, as caixas de Petri inoculadas com explantes do corpo frutífero de *Macrolepiota procera* encontravam-se livres de contaminações e a superfície do meio agarizado totalmente colonizada por uma densa camada de micélio, que cresceu de forma concêntrica e uniforme a partir de cada explante. Após confirmação da identidade por análise molecular (Tab. 3.5), foi atribuído o código de coleção MP.08.12/17.CBR a esta cultura pura de *M. procera* e foi guardada, com as restantes culturas, na coleção do Laboratório de Biologia Molecular.

Tabela 3.5: Detalhe da análise molecular à cultura pura de *Macrolepiota procera*

Espécie	Referência GenBank	Valores de cobertura (%)	Valores de similaridade (%)
<i>Macrolepiota procera</i>	JQ683121.1	97	100

Ao fim de 15 dias da repicagem do meio sólido para o meio líquido BAF [116] já se observava desenvolvimento de hifas imersas e à superfície do meio. As hifas imersas, com aspeto de aglomerado e as da superfície, com aspeto ramificado, chegando estas a fixar-se nas paredes interiores dos balões de Erlenmeyer.

No crescimento da *spawn* em grão de cereal o micélio desenvolveu-se livre de contaminações (observáveis a olho nu), apresentando um aroma e uma coloração branca característicos da espécie *M. procera*.

O melhor resultado foi obtido com a mistura de 70 % aveia + 30 % trigo, pois nesta o substrato ficou totalmente colonizado em 26 dias, resultado obtido nas 5 réplicas. Nas restantes misturas a colonização do substrato foi menos eficiente, não se chegando a obter uma colonização total nas 5 réplicas. Tendo em conta estes resultados, estabeleceu-se uma meta de 30 dias para a avaliação da colonização. Ao fim dos 30 dias, na mistura de 100 % aveia contabilizaram-se 3 recipientes totalmente colonizados pelas hifas do fungo e 2 em que ainda se encontravam áreas de cereal por colonizar. Na mistura de 100 % trigo, ao fim dos 30 dias, observou-se um crescimento homogéneo de micélio à superfície e até aos 4 cm de profundidade. Abaixo desta profundidade, onde era notória a presença de água e de cereal extremamente “empapado”, não houve crescimento. Resultado verificado em todos os 5 recipientes.

### **3.3.2. Efeito dos diferentes substratos de produção e recipientes no crescimento do micélio**

Com os três substratos de produção em sacos e recipientes, obtiveram-se diferentes percentagens de colonização do micélio de *M. procera* ao fim dos 40 dias de crescimento na estufa.

Todos os recipientes com tampa com filtro HEPA, com os três substratos, encontravam-se totalmente colonizados ao fim dos 40 dias na estufa.

Nos sacos de autoclave, o crescimento mais homogêneo do micélio, com cerca de 90 % de colonização, ocorreu no substrato com folhas de carvalho + estrume de cavalo. Em ambos os substratos com palha de trigo + estrume de cavalo e palha de arroz + estrume de cavalo, registaram-se percentagens de colonização do micélio de 75-80 %, sendo visíveis mais zonas onde o fungo não chegou a colonizar (Fig. 3.6).

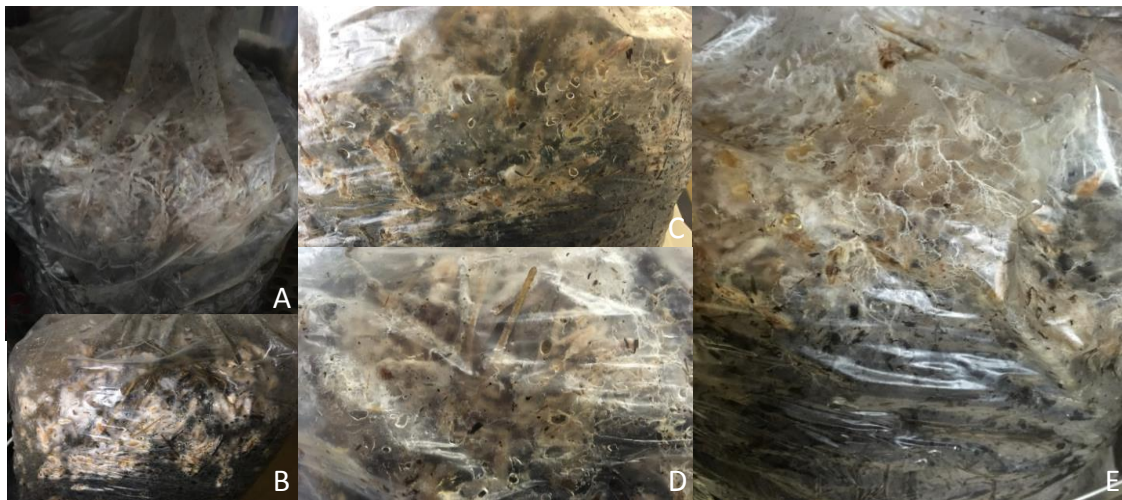


Figura 3.6: Sacos de autoclave colonizados com *Macrolepiota procera*. Misturas (1:1) de: palha de arroz + estrume de cavalo (A e E); palha de trigo + estrume de cavalo (B e D); folhas de carvalho + estrume de cavalo (C)

### 3.3.3. Tentativa de indução da formação de corpos frutíferos

Dez dias após a aplicação das diferentes receitas de terra de cobertura sobre os diversos substratos de produção de *M. procera* (descritos no subtópico 3.3.2.), verificou-se que em todos os casos ocorreu colonização das terras de cobertura, dado que se observava micélio branco na sua superfície.

Não houve diferenças de colonização por parte do fungo entre os substratos colocados em recipientes com tampa com filtro HEPA e em sacos de autoclave.

Os substratos cuja terra de cobertura era à base de manta morta apresentavam ligeiramente maior densidade de hifas nessa camada que os substratos com terra de cobertura à base de turfa.

Nos referidos substratos com terra de cobertura constituída por manta morta, não



se registaram diferenças visíveis a olho nu entre a colonização na manta morta sem tratamento, na pasteurizada ou na esterilizada.

No caso dos substratos com terra de cobertura maioritariamente constituída por turfa também não se registaram diferenças visualmente significativas na colonização dessa camada (Fig. 3.7).

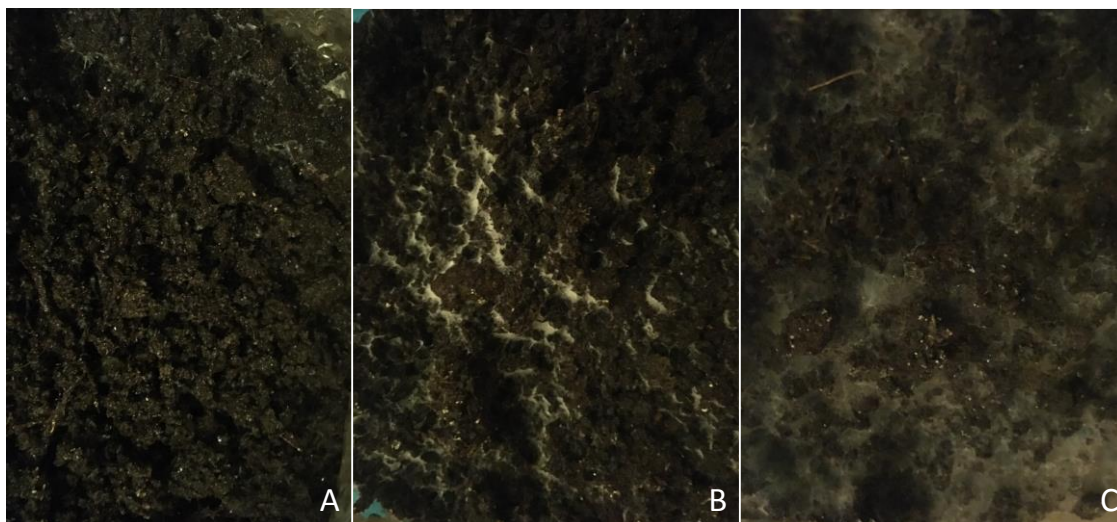


Figura 3.7: Colonização superficial dos substratos com terra de cobertura à base de turfa: antes (A), após o primeiro (B) e após o segundo (C) tratamentos

Cinco dias após a aplicação do primeiro tratamento para a indução da formação de corpos frutíferos (Tab. 3.6), verificou-se que o micélio apresentava crescimento em todos as cinco receitas diferentes de terra de cobertura.

Nos substratos com terra de cobertura à base de manta morta esse crescimento traduziu-se na formação de pequenas massas densas de hifas em determinados locais da superfície (Figs. 3.8 e 3.10). Essas massas densas de hifas apareceram em maior número nos sacos de autoclave do que nos recipientes.

Nos substratos com terra de cobertura à base de turfa não se registou a formação de massas densas, mas foi notório o aparecimento de hifas provenientes do interior da terra de cobertura para a superfície, contudo estas não cobriam essa camada por completo (Fig. 3.7). Nos referidos substratos com terra de cobertura à base de turfa a colonização foi visualmente igual nos contentores (recipientes e sacos).



Figura 3.8: Pequenas massas densas de hifas, de *Macrolepiota procera*, em certos pontos da superfície da terra de cobertura com manta morta, após o primeiro tratamento

Nos substratos sujeitos ao segundo tratamento para a indução da formação de corpos frutíferos (Tab. 3.7) não se registou desenvolvimento do micélio nas cinco receitas diferentes de terra de cobertura durante os cinco dias em que estiveram submetidos a temperaturas de refrigeração.

O desenvolvimento do micélio voltou a ser notório, de forma bastante vigorosa, após a mudança para a sala de cultivo.

De facto, na avaliação efetuada cinco dias após o regresso à sala de cultivo, foi visível um grande aumento da densidade de hifas à superfície, com um cheiro característico e intenso, textura algodonosa, que cobria por inteiro a superfície das cinco receitas diferentes de terra de cobertura.

Em todos os substratos cobertos com manta morta, a coloração castanha característica desta ficou quase impercetível devido à elevada densidade de hifas de cor branca, independentemente dos contentores utilizados (Fig. 3.9).

Nos substratos com terra de cobertura à base de turfa também se registou elevada colonização superficial, encontrando-se a turfa praticamente coberta pelo fungo mas com menor densidade de hifas e conseqüente coloração menos intensa que nos substratos cobertos com manta morta (Fig. 3.7).



Figura 3.9: Formação de elevada densidade de hifas à superfície das terras de cobertura após aplicação do segundo tratamento

Tabela 3.6: Resultados do primeiro tratamento para a indução da formação de corpos frutíferos

Substrato (1:1)	folhas de carvalho + estrume de cavalo						palha de trigo + estrume de cavalo						palha de arroz + estrume de cavalo					
	Recipiente			Saco			Recipiente			Saco			Recipiente			Sacos		
	MMST	MMP	MME	TGCA	TG	—	MMST	MMP	MME	TGCA	TG	—	MMST	MMP	MME	TGCA	TG	—
Conteiner																		
Terra de Cobertura																		
Aparecimento de massas micélio	X	X	X	—	—	—	X	X	X	—	—	—	X	X	X	—	—	—

Tabela 3.7: Resultados do segundo tratamento para a indução da formação de corpos frutíferos

Substrato (1:1)	folhas de carvalho + estrume de cavalo						palha de trigo + estrume de cavalo						palha de arroz + estrume de cavalo					
	Recipiente			Saco			Recipiente			Saco			Recipiente			Sacos		
	MMST	MMP	MME	TGCA	TG	—	MMST	MMP	MME	TGCA	TG	—	MMST	MMP	MME	TGCA	TG	—
Conteiner																		
Terra de Cobertura																		
Aparecimento de massas micélio																		

MMST Manta Morta Sem Tratamento

MMP Manta Morta Pasteurizada

MME Manta Morta Esterilizada

TG Turfa + Gesso (9:1)

TGCA Turfa + Gesso + Carvão Ativado (9:1:1)

Vinte dias após a aplicação dos dois tratamentos para a indução da formação de corpos frutíferos, não se observou a formação de corpos frutíferos de *M. procera*. Pelo contrário, começou a ser perceptível a degeneração do micélio, traduzida pela plasmólise das hifas do fungo (Fig. 3.11) e pela alteração da cor dos três substratos (escurecimento).



Figura 3.10: Estrutura onde se iniciou a formação do corpo frutífero na natureza (A); pequena massa de micélio formada à superfície da terra de cobertura com manta morta em condições laboratoriais (B)



Figura 3.11: Degeneração do micélio de *Macrolepiota procera*

## Capítulo 4 - Discussão

### 4.1. Caracterização das ectomicorrizas de *Eucalyptus globulus* + *Hydnum repandum* colhidas em condições naturais

Apesar das referências acerca da presença de corpos frutíferos de *Hydnum repandum* em florestas de coníferas e de diversas espécies de folhosas – com base na ocorrência de corpos frutíferos [102], [114], a descrição de ectomicorrizas formadas por *H. repandum* é escassa. Na verdade, na literatura científica apenas foram encontradas descrições de ectomicorrizas de *H. repandum* em associação com *Dryas octopetala* [131] e de *H. rufescens* em associação com *Picea* sp. [109], [132].

Morfologicamente é possível distinguir as espécies *H. repandum* e *H. rufescens* através do tamanho, forma e cor do corpo frutífero, a posição da estipe e a distribuição das agulhas do himénio, sem ter de se recorrer a ferramentas moleculares. Reforçando estas diferenças fenotípicas entre as duas espécies, Grebenc *et al.* [133] apontam a existência de um elevado número de polimorfismos ao nível da região ITS, mostrando uma considerada variabilidade genética nestas duas espécies. O mesmo autor sugere que devem ser feitos estudos, das ectomicorrizas e dos possíveis parceiros vegetais de *H. repandum* e *H. rufescens*, de forma a poder-se explicar esta variabilidade a nível molecular.

Analisando as três (*H. repandum* + *D. octopétala* [131]; *H. rufescens* + *Picea* sp. [109]; *H. repandum* + *E. globulus*) descrições de ectomicorrizas do género *Hydnum* pode concluir-se que estas se caracterizam por terem sistema de ramificação monopodial-piramidal. As extremidades não ramificadas podem ser retas ou dobradas, com as extremidades distais cilíndricas, até 0.5 mm de diâmetro, com cores claras. O manto é visível, não transparente e sem laticíferos. As hifas emergentes estão presentes, são poucos frequentes e estão concentradas distalmente. As hifas que compõem o manto têm 25 µm de diâmetro máximo e um arranjo irregular. As micorrizas de *H. repandum* podem atingir os 6 mm de comprimento e apresentar uma tonalidade laranja/laranja

esbranquiçada, enquanto que as micorrizas de *H. rufescens*, atingem os 3 mm de comprimento máximo e apresentam cor branca.

Apesar de neste trabalho não se ter observado nenhum padrão especial discernível nas micorrizas, Harrington e Mitchell [131] observaram um padrão enredado nas camadas mais profundas do manto.

A rede de Hartig formada por *H. repandum*, em associação com *E. globulus* e *D. octopetala* envolve também as células corticais [131].

Segundo Agerer e Rambold [109], a identidade do fungo é determinante na estrutura anatómica das ectomicorrizas, pelo que estas são idênticas para as mesmas espécies de fungos, independentemente do parceiro vegetal. Por outro lado, os caracteres morfológicos da estrutura formada parecem ser determinados pelo género da planta, ainda que alguns fungos possam controlar, pelo menos parcialmente, a forma final. Ambos os aspetos são verdadeiros para as ectomicorrizas da espécie *H. repandum*, quando associadas a *E. globulus* e a *D. octopetala*.

## **4.2. Síntese micorrízica *in vitro*: *Eucalyptus globulus* e diversos fungos ectomicorrízicos comestíveis**

Contrariando os resultados de Peksen *et al.* [134], neste ensaio não se conseguiu isolar *Hydnum repandum* através de explantes do corpo frutífero deste fungo. Uma vez que os corpos frutíferos de onde se tentou o isolamento foram esterilizados e seccionados em ambiente estéril, o aparecimento de bactérias junto de todos os explantes poderá ser devido à presença de bactérias endocelulares, que exercem importantes funções bioquímicas para os seus hospedeiros fúngicos, em troca de um nicho exclusivo, como descrevem Minerdi *et al.* [135].

Ao contrário do reportado por Liang *et al.* [136], os fragmentos de tecido de *Boletus edulis* em meio PDA (Difco<sup>TM</sup>) não demonstraram qualquer resposta, pelo que este fungo terá de ser isolado noutra meio.



Nas placas onde se tentou isolar *H. repandum* através de ectomicorrizas, embora estas tenham sido esterilizadas, houve contaminação pelo fungo saprófita *Epicoccum nigrum*. Este facto comprova a dificuldade de isolamento de culturas desta espécie, pelo que para o seu isolamento será necessário aplicar outro método que seja mais eficiente.

A cultura de *Boletus fragrans* repicada a partir de uma cultura da coleção do Laboratório de Biologia Molecular, não apresentou qualquer crescimento de hifas dos explantes, admitindo-se que o fungo tivesse perdido a sua capacidade de crescimento celular. A repicagem das culturas puras, de *Lactarius deliciosus*, *Tricholoma equestre* e *T. portentosum*, mantidas no Laboratório, foi bem-sucedida. Este sucesso no isolamento corrobora os resultados obtidos por Smith e Onions [137], que reportaram o armazenamento de culturas em meio líquido, a temperaturas de refrigeração, como um bom método para manter as culturas de fungos vivas.

Os fungos tiveram um bom desenvolvimento durante o aumento de escala em meio líquido BAF [116], tendo-se registado a formação de aglomerados de micélio, como descrito por Paul e Thomas [138]. Esta aglomeração poderá ter resultado da fraca intensidade de agitação do meio, uma vez que esta foi feita de maneira manual, durante 20 segundos, de 3 em 3 dias. Estudos conduzidos por Yang e Liao [139] sustentam esta hipótese.

Para a obtenção de plântulas de *Eucalyptus globulus* para os ensaios de micorrização foram testados quatro protocolos de esterilização superficial e germinação de sementes. Comparando as percentagens de germinação dos quatro protocolos, o protocolo 2 foi o que obteve maior percentagem de germinação (86 %), porém a diferença de germinação quando comparada com os restantes não permitiu concluir que o hipoclorito de sódio (3 %) tenha tido influência na viabilidade das sementes, uma vez que as percentagens de germinação foram muito semelhantes. Os resultados obtidos neste ensaio puderam ser comparados entre si, contudo não puderam ser comparáveis com outros resultados da bibliografia, uma vez que sementes colhidas noutros locais, noutro ano e manuseadas de maneira diferente, poderão ter percentagens de germinação diferentes (todas as sementes utilizadas neste ensaio tiveram a mesma

proveniência, foram colhidas no mesmo ano e estiveram sujeitas às mesmas condições desde a colheita até ao início do ensaio).

Comparando as percentagens de contaminação dos quatro protocolos, o protocolo 3, aquele em que as sementes foram deixadas em água dentro dos Eppendorfs ao invés de serem imediatamente plaqueadas, implicou um manuseamento “extra” das sementes, o que poderá explicar a maior contaminação neste protocolo que nos outros três protocolos (20%).

O protocolo 1 foi o único em que as sementes foram plaqueadas diretamente do recipiente de esterilização para o meio de germinação, tendo todo o processo, desde a esterilização até ao plaqueamento, ocorrido dentro da câmara de fluxo, explicando-se assim a inexistência de qualquer contaminação neste protocolo. Embora nos protocolos 2, 3 e 4 as sementes tenham sido esterilizadas dentro de Eppendorfs, foi necessário passá-las para uma caixa de Petri vazia (no interior da câmara de fluxo laminar) para que pudessem ser plaqueadas, estando aí expostas a possíveis contaminações.

Face a estes resultados, escolheu-se o protocolo 1 para a obtenção de plântulas para a síntese de ectomicorrizas, por este apresentar uma elevada taxa de germinação, associada à ausência de contaminação e ser fácil de aplicar em grande escala.

Para a optimização das condições de crescimento de *E. globulus* utilizaram-se diversas composições e percentagens de substrato em recipientes com tampa com filtro HEPA. O uso destes recipientes permitiu a manutenção da água no seu interior e as trocas gasosas, sem que houvesse risco de contaminação, possibilitando um microambiente que potenciou o elevado crescimento das plantas.

Os volumes de 100 mL e 300 mL de substrato por recipiente foram ensaiados, mas de imediato eliminados, isto é, não foram utilizados para as plantas transplantadas das caixas de Petri. Assim, 100 mL de substrato por recipiente representava um volume insuficiente para o desenvolvimento das raízes, sendo também incapaz de proteger as raízes e o fungo que viria a ser inoculado, contra foto-oxidação [140]. Por outro lado, 300 mL de substrato por recipiente aparentava ser um volume de substrato excessivo, podendo vir a ameaçar a vitalidade das plantas quando estas crescessem,

uma vez que a planta poderia entrar em contato com as paredes do recipiente levando a um apodrecimento dos tecidos vegetais [68].

Quanto à otimização do substrato, as plantas que cresceram no substrato perlite + turfa + areão de rio lavado (4:2:1) + meio MS [112] a  $\frac{1}{2}$ , apresentavam maior firmeza ao choque em comparação com as que cresceram em perlite + turfa (1:1). Esta firmeza poderá estar associada à presença do areão que conferiu consistência ao substrato quando este se encontrava com muita água e além disso, possibilitou uma melhor fixação das raízes das plantas de *E. globulus*. Os melhores resultados em termos de crescimento em altura das plantas foram obtidos no ensaio com 200 mL perlite + turfa + areão de rio lavado (4:2:1) + 100 mL de meio MS [112] a  $\frac{1}{2}$ , facto que pode estar relacionado com a presença de maior firmeza da planta no substrato, associado à elevada quantidade de água disponível no ensaio.

É sabido que a disponibilidade de água está diretamente relacionada com o crescimento e desenvolvimento de muitas espécies de eucaliptos [90]. No ensaio 200 mL perlite + turfa + areão de rio lavado (4:2:1) + 120 mL de meio MS [112] a  $\frac{1}{2}$ , a capacidade de retenção de água do substrato foi ultrapassada, sendo impossível plantar as plântulas. Este facto não ocorreu no ensaio com 200 mL perlite + turfa (1:1) + 120 mL de meio MS [112] a  $\frac{1}{2}$ , muito possivelmente devido à maior percentagem de turfa utilizada, uma vez que esta tem uma maior capacidade de retenção de água que a perlite. Contudo, neste último ensaio, não havia areão de rio para suportar uma maior fixação das raízes, nem dar consistência ao substrato, o que explica o facto de as plantas no seu interior não terem alcançado as mesmas dimensões que as plantas do substrato perlite + turfa + areão de rio lavado (4:2:1) + 100 mL de meio MS [112] a  $\frac{1}{2}$ .

Volumes de 60 mL de meio MS [112] a  $\frac{1}{2}$ , adicionados aos substratos, demonstraram ser insuficientes para permitir o desenvolvimento das plantas.

As raízes colonizaram de modo homogéneo ambos os substratos testados, muito possivelmente devido ao facto de a perlite proporcionar porosidade ao substrato, evitando assim a sua compactação [141], [142].

Da análise global dos resultados de crescimento e firmeza das plantas resultou a escolha do substrato 200 mL perlite + turfa + areão de rio lavado (4:2:1) + 100 mL de meio

MS [112] a ½ para a síntese de ectomicorrizas.

Em relação à síntese de micorrizas *in vitro*, não se obtiveram resultados positivos em nenhum dos métodos de micorrização utilizados. Este resultado poderá ter sido devido a diversos fatores como: 1) a incompatibilidade entre fungo e planta; 2) a inviabilidade do inóculo fúngico; 3) a quantidade insuficiente de fungo inoculado face ao volume do substrato; 4) o período de duração da experiência insuficiente para o estabelecimento de micorrizas; 5) o excesso de calor sentido no interior dos recipientes.

1) A incompatibilidade entre fungo e planta como uma hipótese para explicar a não formação de micorrizas *in vitro* não se poderá aplicar a todas as combinações ensaiadas, uma vez que foram observadas ectomicorrizas de *H. repandum* com *E. globulus* em condições naturais e como descrito no tópico **4.1.** desta dissertação. Além disso, a espécie *P. tinctorius* é um parceiro fúngico muito frequente em plantações de eucaliptos, compostas por *E. globulus*, já tendo sido descritas ectomicorrizas formadas pelas duas espécies [114], [115], [143]. Sabe-se também que diferentes isolados fúngicos ou ecótipos podem ter diferentes graus de especificidade e compatibilidade quanto ao parceiro vegetal [144].

2) A inviabilidade do inóculo fúngico é uma hipótese provável para a ineficácia do método em que se utilizou uma mistura de esporos e fragmentos do himénio para inocular os eucaliptos, uma vez que pode admitir-se que não tenha ocorrido germinação dos esporos, embora este método já tenha sido usado com sucesso por Lu *et al.* [82]. O período que decorreu entre o momento da colheita do solo usado para o método de *soil trap* até à sua utilização, poderá ter inviabilizado o material fúngico presente, devido a um longo período em condições pouco naturais. Nos recipientes inoculados pelo método em que os fungos cresceram em meio líquido esta hipótese é descartada, uma vez que no momento anterior à inoculação, a colonização do meio líquido pelo micélio fúngico indicava, inequivocamente, o vigor do micélio [138].

3) A quantidade de fungo inoculado face ao volume de substrato poderá ter sido insuficiente e inviabilizado o estabelecimento de micorrizas nos recipientes inoculados com culturas de fungo em meio líquido, tal como é referido por Stamets e Chilton [41]. A

mesma explicação poderá ser aplicada ao par *E. globulus/H. repandum* em que se utilizou uma mistura de esporos e fragmentos do himénio para inocular os eucaliptos, pois segundo Lu *et al.* [82] a densidade de esporos pode influenciar a formação de micorrizas. No entanto, Brundrett *et al.* [145] refutaram esta relação, afirmando que há uma fraca correlação entre o volume de esporos aplicado e o sucesso da inoculação por este método. A presença de bactérias poderá ter um efeito sinérgico e influenciar a formação de micorrizas [146]. Para evitar que a quantidade de fungo inoculado pudesse ser um impedimento ao estabelecimento de micorrizas, poder-se-ia ter recorrido a um segundo momento de inoculação como o efetuado por Brundrett *et al.* [145]. Nos ensaios em que se usou *soil trap*, esta explicação é descartada pois segundo Trappe [147], através deste método, é muito fácil estabelecer relações de simbiose entre fungos ectomicorrízicos e plantas. Uma outra maneira de contornar o problema da quantidade insuficiente de fungo inoculado face ao volume de substrato, passaria pela utilização de outros métodos de estabelecimento de micorrizas de *E. globulus*, como a colocação das radículas das plântulas dos *E. globulus* em contato direto com o fungo a crescer em meio agarizado [143], [144] ou o método de *paper-sandwich* [148], [149]. Estes métodos proporcionam um maior contacto fungo-planta, desde os primeiros dias após a germinação, através da maior quantidade de inóculo fúngico colocado diretamente em contato com a parte radicular das plântulas. Além disso, o fungo já se encontra bem desenvolvido, aumentando a probabilidade de ocorrer micorrização, pois o stresse induzido com a presença da planta é menor. Em contrapartida, estes métodos são muito suscetíveis a contaminações e têm percentagens baixas de sobrevivência das plantas pois, estas estão sujeitas a condições elevadas de stresse, quando são transferidas para o contato direto com o fungo, logo no início do seu desenvolvimento [68].

4) Em outros ensaios de micorrização *in vitro*, seguindo métodos semelhantes aos usados neste ensaio, ocorreu formação de micorrizas entre 3 a 4 meses após o início dos mesmos [82], [141], [142], [150]. Estes resultados tornam menos plausível a hipótese de não ter ocorrido formação de micorrizas devido ao curto período de duração, 4 meses, da experiência.

5) O excesso de calor sentido no interior dos recipientes devido às temperaturas

elevadas na estufa de crescimento exterior, nos dias de maior calor, poderá ter desnaturado enzimas importantes na catálise dos processos metabólicos fúngicos [151], limitando a possibilidade do estabelecimento da relação mutualista fungo-planta, fazendo com que a única espécie a crescer nos recipientes fosse a espécie vegetal, *E. globulus*. Temperaturas superiores a 30-34 °C, estão relatadas em vários estudos como inibitórias do crescimento de micélio das espécies fúngicas usadas nesta experiência [68], [69], [117], [134], [152].

Embora as metodologias utilizadas para a inoculação das plantas neste trabalho já tenham sido usadas com sucesso em trabalhos anteriores, a ação dos fatores acima analisados, individualmente ou a sua combinação, poderá efetivamente, ter sido a causa para o insucesso do estabelecimento de micorrizas em *E. globulus*.

### **4.3. Otimização das condições de crescimento de micélio e tentativa de frutificação de *Macrolepiota procera***

O isolamento de culturas puras de micélio de *Macrolepiota procera* em meio PDA (Difco™) foi bem sucedida, tendo o fungo colonizado rapidamente o meio de cultura com uma camada densa de hifas, como observado por Carvalho [69].

Na primeira etapa do processo de aumento de escala (passagem do meio sólido para o meio líquido), o meio líquido BAF, a 30 °C, com pH 7, promoveu o crescimento de *M. procera*, como era esperado [56], [69]. Tal como descrito por Woźniak [57], ocorreu um bom crescimento do micélio, mesmo com fraca agitação, contudo esta não foi suficiente para impedir a formação de aglomerados de hifas do fungo, no meio líquido. À superfície do meio, houve uma expansão de hifas bastante ramificada, podendo esta ser explicada como uma resposta do fungo aos baixos níveis de oxigénio existentes no meio líquido, com o objetivo de captar o máximo possível deste gás. Esta interpretação é sustentada pelo trabalho de Vardar e Lilly [153], onde o oxigénio é considerado o elemento fisiológico mais importante, cuja escassez pode resultar na supressão ou mesmo na inibição total do crescimento de fungos aeróbicos. Emelyanova [154] obteve um melhor crescimento de micélio quando submergiu as culturas fúngicas em soluções

suplementadas com oxigénio.

Na segunda etapa do processo de aumento de escala (produção de *spawn*), comparou-se o efeito das misturas de substratos, constituídas por grãos de cereais (duas espécies e três composições). O melhor crescimento fúngico foi obtido na mistura 70 % aveia + 30 % trigo, muito possivelmente devido à porosidade, tamanho e consistência da mistura dos grãos. Tinoco *et al.* [155] confirmam esta hipótese pois observaram que superfícies maiores e mais porosas são mais propícias ao estabelecimento e crescimento de micélio. Outros autores descreveram a mistura 100 % aveia como adequada à produção de *spawn* de outras espécies de fungos saprófitas (e. g. [41], [46]). A mistura 100 % trigo que se encontrava demasiado “empapada”, muito possivelmente devido ao excesso de tempo de cozedura, foi a que proporcionou menor crescimento do micélio, tal como o observado por Stanley [156]. A compactação do grão e a água em excesso, terão levado à diminuição do arejamento e da concentração de oxigénio nas camadas inferiores do substrato [157]. O oxigénio desempenha um papel crucial no metabolismo celular, sendo essencial para a respiração do fungo, pelo que a taxa de respiração está diretamente relacionada com a concentração de O<sub>2</sub> no substrato [158]. Contrariando estes resultados, Pekşen e Kibar [58] apontaram a mistura de 100 % trigo, como a mais favorável para o aumento de escala da cultura de micélio de *M. procera*. O recipiente com tampa com o filtro HEPA permitiu as trocas gasosas necessárias e mostrou ser uma barreira eficiente contra as contaminações externas.

A *spawn* obtida foi utilizada para inocular e comparar, diversos substratos de produção para *M. procera*. Ocorreu crescimento do micélio em todos os três substratos de produção, resultado semelhante ao obtido por Pekşen e Kibar [58], tendo o fungo colonizado o substrato com folhas de carvalho + estrume de cavalo mais eficazmente, que os substratos com palhas (trigo ou arroz) + estrume de cavalo. Esta discrepância na colonização poderá estar associada aos diferentes valores de rácio C:N existente nos diferentes substratos [58]. Segundo Philippoussis *et al.* [159], uma elevada concentração de N no substrato tem um efeito negativo no crescimento do micélio. Neste ensaio, a colonização eficiente dos substratos com estrume de cavalo contraria Maki e Paccola-Meirelles [160] que, no seu trabalho com *Macrolepiota bonaerensis*, chegaram à

conclusão que substratos que contêm estrume não proporcionam um desenvolvimento satisfatório do micélio, exceto quando complementados com húmus. Segundo Felgel [161], o substrato que proporciona um crescimento mais rápido de *Macrolepiota gracilenta* é a palha de arroz compostada, contudo neste trabalho, não foi este o substrato de produção que proporcionou um crescimento mais rápido do micélio. Na única referência de produção de *M. procera* encontrada na bibliografia, o micélio colonizou totalmente o substrato de produção entre 30 a 35 dias, à temperatura de 27 – 28 °C [162].

As diferenças na constituição dos diferentes substratos de produção e entre tipos de contentores (recipientes e sacos) não se refletiram na colonização das cinco receitas de terra de cobertura, muito possivelmente devido à elevada percentagem de colonização dos substratos de produção aquando do momento da aplicação da terra de cobertura.

Tal como o sucedido nos trabalhos de Pekşen e Kibar [58] e de Pereira [59] realizados com *M. procera*, não ocorreu formação de corpos frutíferos após aplicação dos estímulos para a sua indução. Porém, nos substratos sujeitos ao primeiro tratamento para a indução da formação de corpos frutíferos apareceram pequenas massas densas de hifas, muito semelhantes às estruturas onde se originam os corpos frutíferos na natureza, em certos pontos da superfície dos substratos cobertos por manta morta (Fig. 3.8.). Massas densas de hifas semelhantes às formadas no presente ensaio foram também observadas por Pereira [59], contudo, não à superfície dos substratos, mas essencialmente nas zonas dos filtros de ar, pelo que se danificavam ao toque.

No presente trabalho, observou-se que estas estruturas apenas se formaram na superfície dos substratos com terra de cobertura à base de manta morta. Esta terá proporcionado um adequado arejamento ao invés dos substratos com terra de cobertura composta maioritariamente por turfa, que é muito mais compacta.

O menor número de massas densas de hifas formadas nos recipientes com tampa com filtro HEPA em relação aos sacos de autoclave, esteve provavelmente associado à menor quantidade de substrato disponível para o fungo.



Por outro lado, nos substratos sujeitos aos estímulos para a indução da formação de corpos frutíferos do segundo tratamento, registou-se grande vigor na colonização da superfície das cinco receitas de terra de cobertura. Esse efeito poderá ter sido devido ao período em que os substratos estiveram no frio que, juntamente com as regas, permitiu um aumento da humidade superficial das terras de cobertura, proporcionando assim um ambiente mais propício ao crescimento do fungo, quando da passagem para a sala de cultivo a 20 °C. Esta colonização da terra de cobertura terá sido excessiva, não se verificando condições para que ocorresse a formação de corpos frutíferos, como explicam Stamets e Chilton [41], nem tão pouco a formação de massas densas de hifas que poderiam originar cogumelos.

O abaixamento da temperatura para perto de temperaturas de refrigeração é um procedimento usualmente utilizado como estímulo para a indução da formação de corpos frutíferos em outras espécies de fungos, como por exemplo *Pleurotus ostreatus* [41], [163].

A não formação de corpos frutíferos em nenhum dos contentores, leva a crer que o reduzido volume dos recipientes em relação aos sacos, não constituiu um estímulo de restrição espacial que, sozinho ou acompanhado de outros estímulos, poderia induzir a formação de corpos frutíferos, como o reportado por Hawker [164]. Observações de campo, sugeriram este estímulo com potencial de indução de corpos frutíferos, uma vez que se observaram cogumelos, com alguma frequência, na margem de caminhos e estradas que serviriam de obstáculo à propagação do micélio de *M. procera*.

Com a utilização de manta morta i) não tratada, ii) pasteurizada e iii) esterilizada como terra de cobertura esperava-se que, em caso de formação de corpos frutíferos, se pudesse correlacionar esta com a presença de bactérias ou endósporos (estruturas de resistência de algumas bactérias), presentes na manta morta, que quando germinados, poderiam ter um efeito indutor na produção de corpos frutíferos. Este efeito foi observado em diversos estudos com a espécie *Agaricus bisporus* [165]–[168]. A pasteurização serviria para destruir as estruturas vegetativas das bactérias, sobrevivendo apenas os endósporos, enquanto que a esterilização eliminaria as bactérias e os endósporos [169]. Uma vez que não se obtiveram corpos frutíferos e o aparecimento de

pequenas massas densas de hifas ocorreu igualmente nos três substratos de produção cobertos por manta morta (não tratada, pasteurizada e esterilizada), esta correlação não pode ser feita.

Maki e Paccola-Meirelles [160] conseguiram produzir corpos frutíferos de *M. bonaerensis* utilizando como estímulo de indução terra de cobertura enriquecida com carvão ativado. Contudo, procedimento semelhante com *M. procera* não teve sucesso. De referir ainda que, ao contrário dos resultados obtidos por Sharma *et al.* [162], em que ao fim de 18-21 dias após a aplicação da terra de cobertura se formaram os primeiros corpos frutíferos, no presente trabalho, ao fim de 25 dias, ocorreu o escurecimento da cor dos três substratos de produção e a degeneração do micélio. Esta ter-se-á devido à plasmólise das hifas, por autólise celular como resultado de alterações metabólicas internas da célula que conduziram à sua destruição, por ação de enzimas lisossômicas [10], o que levou à diminuição do volume dos diferentes substratos.

Relativamente ao ensaio de inoculação na natureza de *spawn* de *M. procera* não se observaram corpos frutíferos até à conclusão deste trabalho escrito, como seria de esperar, devido ao curto intervalo de tempo decorrido desde a inoculação. Esta espécie já foi reportada como tendo sido cultivada com sucesso, isto é com obtenção de corpos frutíferos por métodos de inoculação na natureza, semelhantes ao usado [130], [170].

## Capítulo 5 - Conclusão

Com este trabalho conseguiu provar-se que a espécie fúngica *Hydnum repandum* estabelece uma relação mutualista com a espécie *Eucalyptus globulus*, em condições naturais, fora da área de distribuição nativa da espécie vegetal. Foi efetuada a primeira descrição das ectomicorrizas de *E. globulus* + *H. repandum* (não foi encontrada qualquer referência na literatura), contudo é necessária a observação de mais material para produzir uma descrição mais detalhada.

Os ensaios de síntese *in vitro* de micorrizas de *E. globulus* com diversas espécies de fungos comestíveis não tiveram sucesso. Apesar disso, os resultados obtidos proporcionaram informação relevante para prosseguir os trabalhos de investigação futuros. A tentativa de isolamento em meio PDA a partir de explantes de corpos frutíferos e de pontas micorrízicas de *H. repandum* não foi bem-sucedida, sendo necessário aprimorar um método de isolamento para esta espécie. No caso da espécie *Boletus edulis* será necessário recorrer a um método de isolamento que proporcione condições de crescimento deste fungo, provavelmente meios de cultura com outra composição.

O melhor protocolo para a esterilização e germinação de sementes é o mergulho destas em gobelés com solução de hipoclorito de sódio (3 %) e água destilada intercaladas, em condições assépticas, seguida de inoculação em caixas de Petri com meio MS a ½ + agar. Embora não se tenha obtido a síntese de micorrizas, os recipientes utilizados, com 200 mL de substrato perlite + turfa + areão de rio lavado (4:2:1) + 100 mL de meio MS a ½ + agar, proporcionaram condições ideais para o crescimento saudável das plantas de *E. globulus*. Contudo, apesar de esta metodologia ter proporcionado boas condições de crescimento para a espécie vegetal, o mesmo não aconteceu com as espécies fúngicas, que não colonizaram o substrato. Assim, serão necessários mais estudos a fim de aperfeiçoar a metodologia utilizada de modo a criar igualmente condições adequadas de crescimento das espécies fúngicas, possibilitando, desta forma, a micorrização.

Poder-se-ão utilizar outras metodologias para conseguir a síntese de micorrizas *in vitro* de *E. globulus* com espécies de fungos comestíveis, com o objetivo final de contribuir para a melhor gestão das plantações de eucaliptos; as plantas micorrizadas beneficiarão da associação com menor *apport* de fertilizantes e os cogumelos comestíveis poderão constituir um recurso económico apreciável.

O isolamento de cultura pura de *Macrolepiota procera* não revelou dificuldades uma vez que esta espécie colonizou eficazmente o meio de cultura PDA.

O crescimento da *spawn* na mistura de 70 % aveia + 30 % trigo, através da inoculação de micélio em meio líquido BAF, revelou ser ideal para um desenvolvimento rápido e saudável do fungo. Embora tenham ocorrido pequenas variações em termos de colonização dos diferentes substratos de produção, estas não se manifestaram no desenvolvimento do micélio nas cinco receitas de terra de cobertura. Porém, a aplicação de diversos estímulos de indução de corpos frutíferos não induziu a formação de cogumelos. No entanto, nos substratos cobertos por manta morta que não sofreram estímulo de refrigeração, obtiveram-se pequenas massas densas de hifas, semelhantes às estruturas que originam os corpos frutíferos na natureza. Assim, várias etapas foram encurtadas, para investigações futuras, com a aquisição de conhecimentos importantes desde o momento do isolamento do fungo em cultura pura, passando pelo aumento de escala, até à composição final de substratos prontos a produzir.

A formação de corpos frutíferos constituiu, como esperado, uma fase complexa do ciclo de vida de *M. procera*, revelando-se o grande desafio desta investigação. A aplicação de mais tecnologia (e. g. nebulizador para manter os níveis de humidade constantes), associada à indução de outros estímulos de formação de corpos frutíferos, levará à descoberta do processo de formação, destes tão apreciados cogumelos, em condições controladas.

Esta dissertação veio acrescentar novos conhecimentos de relevância para o desenvolvimento de novos protocolos de produção de cogumelos comestíveis bem como, para a exploração de novas associações micorrízicas de grande interesse económico e biotecnológico.

Tabela suplementar 1: Valores resultantes da primeira avaliação das plantas

<b>Réplicas</b>	<b>Parte Radicular (cm)</b>	<b>Parte Aérea (cm)</b>	<b>Peso Total (g)</b>
1	0.5	0.4	0.0066
2	0.4	0.5	0.0060
3	0.5	0.4	0.0067
4	0.6	0.5	0.0073
5	0.4	0.5	0.0063
6	0.5	0.4	0.0063
7	0.4	0.4	0.0045
8	0.6	0.5	0.0077
9	0.5	0.5	0.0072
10	0.5	0.5	0.0074

Tabela suplementar 2: Valores resultantes da segunda avaliação das plantas

<b>Réplicas</b>	<b>Parte Radicular (cm)</b>	<b>Parte Aérea (cm)</b>	<b>Peso Total (g)</b>
1	2.9	3.0	0.0366
2	3.4	2.6	0.0359
3	3.0	3.5	0.0541
4	2.8	3.0	0.0481
5	3.7	2.9	0.0464
6	3.6	2.8	0.0398
7	3.1	3.4	0.0526
8	3.1	2.9	0.0391
9	3.2	2.9	0.0389
10	3.6	3.1	0.0435

Tabela suplementar 3: Valores resultantes da terceira avaliação das plantas utilizadas como controle negativo

<b>Réplicas</b>	<b>Parte Radicular (cm)</b>	<b>Parte Aérea (cm)</b>	<b>Nº Folhas</b>	<b>Tapete Radicular (g)</b>	<b>Parte aérea (g)</b>	<b>Peso Total (g)</b>
1	13	14	66	1.62	1.37	2.99
2	17	15	44	1.81	1.35	3.16
3	13	14	62	1.89	1.68	3.57
4	16	14	58	1.60	1.46	3.06
5	13	15	48	1.87	1.64	3.51
6	12	14	49	1.82	1.46	3.28
7	13	15	54	2.24	1.85	4.09
8	13	14	46	1.63	1.21	2.84
9	19	14	50	2.09	1.72	3.81
10	11	14	54	1,54	1.13	2.67

## Bibliografía

- [1] P. Raven, G. Johnson, K. Mason, J. Losos, and S. Singer, *Biology*, 6th Ed. The McGraw Hill Companies, 2002.
- [2] E. P. Solomon, L. R. Berg, and D. W. Martin, *Biology*, 7th Ed. Brooks/Cole-Thomson Learning, 2005.
- [3] T. Herrera and M. Ulloa, *El reino de los hongos : micología básica y aplicada*, 1st Ed. Mexico: Universidad Nacional Autónoma de México, 1990.
- [4] J. W. Deacon, *Fungal biology*, 4th Ed. Malden, MA USA: Blackwell Publishing Ltd., 2013.
- [5] S. T. Chang and P. G. Miles, *Mushrooms: Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact*, 2nd Ed. CRC Press, 2004.
- [6] J. Webster and R. Weber, *Introduction to Fungi*, 3rd Ed. New York: Cambridge University Press, 2007.
- [7] D. L. Hawksworth and R. Lücking, "Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species," *Microbiol. Spectr.*, vol. 5, no. 4, pp. 79–95, 2017.
- [8] S. Smith and D. Read, *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd Ed. Academic Press, London, 2008.
- [9] R. Arenas Guzmán, *Micología médica ilustrada*, 4th Ed. McGraw-Hill Interamericana de España S.L., 2014.
- [10] N. A. Campbell, J. B. Reece, and L. G. Mitchell, *Biology*, 5th Ed. Benjamin Cummings, 1999.
- [11] K. M. G. Machado and D. R. Matheus, "Biodegradation of Remazol brilliant blue R by ligninolytic enzymatic complex produced by *Pleurotus ostreatus*," *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 37, no. 4, pp. 468–473, 2006.
- [12] H. Harms, D. Schlosser, and L. Y. Wick, "Untapped potential: Exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 9, no. 3, pp. 177–192, 2011.
- [13] A. B. D. C. Faria, P. H. R. Monteiro, C. G. Auer, and A. C. Ângelo, "Uso de ectomicorrizas na biorremediação florestal," *Cienc. Florest.*, vol. 27, no. 1, pp. 21–29, 2017.
- [14] B. Frank, "On the nutritional dependence of certain trees on root symbiosis with belowground fungi (an English translation of A.B. Frank's classic paper of 1885)," *Mycorrhiza*, vol. 15, no. 4, pp. 267–275, 2005.
- [15] S. W. Behie and M. J. Bidochka, "Nutrient transfer in plant-fungal symbioses," *Trends Plant Sci.*, vol. 19, no. 11, pp. 734–740, 2014.
- [16] M. S. Folli-Pereira, L. S. A. Meira-Haddad, D. M. Soares, M. Catarina, and M. Kasuya, "Micorriza Arbuscular e a tolerancia das plantas ao estresse," *Rev. Bras. Ciência do Solo*, vol. 36, no. 1, pp. 1663–1679, 2012.
- [17] M. G. a Van Der Heijden *et al.*, "Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future," *New Phytol.*, vol. 205, no. 4, pp. 1406–1423, 2015.
- [18] R. T. Koide, C. Fernandez, and G. Malcolm, "Determining place and process: Functional traits of ectomycorrhizal fungi that affect both community structure and ecosystem function," *New Phytol.*, vol. 201, no. 2, pp. 433–439, 2014.
- [19] R. Molina, H. Massicotte, and J. M. Trappe, "Specificity phenomena in mycorrhizal

- symbioses: Community-ecological consequences and practical implications,” in *Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process*, 1st Ed., M. F. Allen, Ed. New York: Chapman and Hall, 1992, pp. 357–423.
- [20] P. F. Cannon *et al.*, “Definition and diversity,” in *State of the World’s Fungi*, Report., K. J. Willis, Ed. Royal Botanic Gardens, Kew, 2018, pp. 4–11.
- [21] J. Guarro, J. Gené, and A. M. Stchigel, “Developments in fungal taxonomy,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 12, no. 3, pp. 454–500, 1999.
- [22] L. Tedersoo, T. W. May, and M. E. Smith, “Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: Global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages,” *Mycorrhiza*, vol. 20, no. 4, pp. 217–263, 2010.
- [23] S. T. Chang and P. G. Miles, “Mushroom biology — A new discipline,” *Mycologist*, vol. 6, no. 2, pp. 64–65, 1992.
- [24] G. M. Smith, *Botânica Criptogâmica*, 3rd Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1979.
- [25] S. P. Wasser, “Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 89, no. 5, pp. 1323–1332, 2011.
- [26] X. M. Wang *et al.*, “A mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wild-grown mushroom from China,” *Food Chem.*, vol. 151, pp. 279–285, 2014.
- [27] M. E. Valverde, T. Hernández-Perez, and O. Paredes-López, “Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life.,” *Int. J. Microbiol.*, pp. 1–14, 2015.
- [28] J. H. Diaz, “Syndromic diagnosis and management of confirmed mushroom poisonings,” *Crit. Care Med.*, vol. 33, no. 2, pp. 427–436, 2005.
- [29] T. Prescott *et al.*, “Useful fungi,” in *State of the World’s Fungi*, Report., K. J. Willis, Ed. Royal Botanic Gardens, Kew, 2018, pp. 24–31.
- [30] E. Boa, *Wild edible fungi: A global overview of their use and importance to people*. FAO, 2004.
- [31] H. H. Chang, P. J. Chien, M. H. Tong, and F. Sheu, “Mushroom immunomodulatory proteins possess potential thermal/freezing resistance, acid/alkali tolerance and dehydration stability,” *Food Chem.*, vol. 105, no. 2, pp. 597–605, 2007.
- [32] I. C.F.R. Ferreira, J. A. Vaz, M. H. Vasconcelos, and A. Martins, “Compounds from Wild Mushrooms with Antitumor Potential,” *Anticancer. Agents Med. Chem.*, vol. 10, no. 5, pp. 424–436, 2010.
- [33] A. A. J. Carneiro *et al.*, “Chemical composition and antioxidant activity of dried powder formulations of *Agaricus blazei* and *Lentinus edodes*,” *Food Chem.*, vol. 138, no. 4, pp. 2168–2173, 2013.
- [34] T. C. Finimundy *et al.*, “Aqueous extracts of *Lentinula edodes* and *Pleurotus sajor-caju* exhibit high antioxidant capability and promising in vitro antitumor activity,” *Nutr. Res.*, vol. 33, no. 1, pp. 76–84, 2013.
- [35] M. J. Alves, I. C. F. R. Ferreira, J. Dias, V. Teixeira, and A. Martins, “A Review on Antifungal Activity of Mushroom (basidiomycetes) extracts and isolated compounds,” *Planta Med.*, vol. 78, no. 16, pp. 1707–1718, 2013.
- [36] I. Türkekul, F. Çetin, and M. Elmastaş, “Fatty acid composition and antioxidant capacity of some medicinal mushrooms in Turkey,” *J. Appl. Biol. Chem.*, vol. 60, no. 1, pp. 35–39, 2017.



- [37] E. H. Lucas, R. L. Ringler, R. U. Byerrum, J. A. Stevens, D. A. Clarke, and C. C. Stock, "Tumor inhibitors in *Boletus edulis* and other holobasidiomycetes," *Antibiot. Chemother.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–4, 1957.
- [38] D. J. Royse, J. Baars, and Q. Tan, "Current Overview of Mushroom Production in the World," in *Edible and Medicinal Mushrooms*, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2017, pp. 5–13.
- [39] P. Mattila and K. Ko, "Contents of Vitamins, Mineral Elements, and Some Phenolic Compounds in Cultivated Mushrooms," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, pp. 2343–2348, 2001.
- [40] P. Manzi, A. Aguzzi, and L. Pizzoferrato, "Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy," *Food Chem.*, vol. 73, no. 3, pp. 321–325, 2001.
- [41] P. Stamets and J. S. Chilton, *The Mushroom Cultivator- A Practical Guide to Growing Mushrooms at Home*. Agarikon Press, 1983.
- [42] M. Rühl, C. Fischer, and U. Kües, "Ligninolytic enzyme activities alternate with mushroom production during industrial cultivation of *Pleurotus ostreatus* on wheat- straw-based substrate," *Curr. Trends Biotechnol. Pharm.*, vol. 2, no. 4, pp. 478–492, 2008.
- [43] C. Sánchez, "Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 85, no. 5, pp. 1321–1337, 2010.
- [44] K. Yamanaka, "I. Production of cultivated edible mushrooms," *Food Rev. Int.*, vol. 13, no. 3, pp. 327–333, 1997.
- [45] K. M. Alananbeh, N. A. Bouqellah, and N. S. Al Kaff, "Cultivation of oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* on date-palm leaves mixed with other agro-wastes in Saudi Arabia," *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 21, no. 6, pp. 616–625, 2014.
- [46] A. F. Borges, *Como Produzir Cogumelos*, 1st Ed. Litexa, 2006.
- [47] K. Kusters and B. Belcher, *Forest products, livelihoods and conservation: Case Studies of Non-Timber Forest Product Systems. Volume 1 -Asien*, vol. 1. 2004.
- [48] P. Oei and B. van Nieuwenhuijzen, *Agrodok 40 Small-scale mushroom cultivation oyster, shiitake and wood ear mushrooms*, no. 40. Agromisa Foundation and CTA, 2005.
- [49] E. C. Vellinga, R. P. J. de Kok, and T. D. Bruns, "Phylogeny and taxonomy of *Macrolepiota* (Agaricaceae)," *Mycologia*, vol. 95, no. 3, pp. 442–456, 2003.
- [50] P. Harding, *Mushrooms & Toadstools*, 1st Ed. HarperCollinsPublishers, 2003.
- [51] P. Kalač, "Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review," *Food Chem.*, vol. 113, no. 1, pp. 9–16, 2009.
- [52] M. Kosanić, B. Ranković, A. Rančić, and T. Stanojković, "Evaluation of metal concentration and antioxidant, antimicrobial, and anticancer potentials of two edible mushrooms *Lactarius deliciosus* and *Macrolepiota procera*," *J. Food Drug Anal.*, vol. 24, no. 3, pp. 477–484, 2016.
- [53] H.-P. Chen *et al.*, "Anti-Proliferative and Anti-Inflammatory Lanostane Triterpenoids from the Polish Edible Mushroom *Macrolepiota procera*," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 66, no. 12, pp. 3146–3154, 2018.
- [54] D. I. Strumińska-Parulska, G. Olszewski, and J. Falandysz, "210Po and 210Pb bioaccumulation and possible related dose assessment in parasol mushroom (*Macrolepiota procera*)," *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 24, no. 34, pp. 26858–26864, 2017.

- [55] L. Svoboda, K. Zimmermannová, and P. Kalač, "Concentrations of mercury, cadmium, lead and copper in fruiting bodies of edible mushrooms in an emission area of a copper smelter and a mercury smelter," *Sci. Total Environ.*, vol. 246, no. 1, pp. 61–67, 2000.
- [56] S. M. Shim *et al.*, "The Characteristics of Cultural Conditions for the Mycelial Growth of *Macrolepiota procera*," *Mycobiology*, vol. 33, no. 1, p. 15, 2005.
- [57] W. Woźniak, "Production and quality appraisal of mycelium of parasol mushroom *Macrolepiota procera*," *Herba Pol.*, vol. 55, no. 3, pp. 285–291, 2009.
- [58] A. Pekşen and B. Kibar, "Investigations on the Cultivation of Wild Edible Mushroom *Macrolepiota procera*," *Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilim. Derg.*, vol. 3, no. 2, pp. 68–79, 2017.
- [59] C. N. Pereira, "Produção de *Morchella esculenta* e de *Macrolepiota procera* e estudo de novos substratos para a produção de cogumelos saprófitas," Dissertação de mestrado, Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, 2014.
- [60] M. de Román and E. Boa, "Collection, marketing and cultivation of edible fungi in Spain," *Micol. Apl. Int.*, vol. 16, no. 2, pp. 25–33, 2004.
- [61] W. Yun and I. R. Hall, "Edible ectomycorrhizal mushrooms: challenges and achievements," *Can. J. Bot.*, vol. 82, no. 8, pp. 1063–1073, 2004.
- [62] A. Morte, M. Honrubia, and A. Gutiérrez, "Biotechnology and Cultivation of Desert Truffles," in *Mycorrhiza*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008, pp. 467–483.
- [63] J. M. Savoie and M. L. Largeteau, "Production of edible mushrooms in forests: Trends in development of a mycosilviculture," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 89, no. 4, pp. 971–979, 2011.
- [64] A. Guerin-Laguette, C. Plassard, and D. Mousain, "Effects of experimental conditions on mycorrhizal relationships between *Pinus sylvestris* and *Lactarius deliciosus* and unprecedented fruit-body formation of the Saffron milk cap under controlled soilless conditions," *Can. J. Microbiol.*, vol. 46, no. 9, pp. 790–799, 2000.
- [65] A. Guerin-Laguette *et al.*, "Lactarius deliciosus and *Pinus radiata* in New Zealand: towards the development of innovative gourmet mushroom orchards," *Mycorrhiza*, vol. 24, no. 7, pp. 511–523, 2014.
- [66] B. Águeda *et al.*, "Mycorrhizal synthesis between *Boletus edulis* species complex and rockroses (*Cistus* sp.)," *Mycorrhiza*, vol. 18, no. 8, pp. 443–449, 2008.
- [67] A. Rodríguez and F. J. F. de Ana Magán, "Evolución de una colonia de un hongo ectomicorrícico, *Boletus fragrans*, bajo castaños híbridos," *Congr. For. Español*, pp. 409–414, 1993.
- [68] R. F. Martins, "Ectomycorrhizal associations of edible fungi and *Cistus* spp.: from field studies to in vitro synthesis. Dissertação de mestrado," Dissertação de Mestrado, Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2016.
- [69] P. D. Carvalho, "Studies of mycorrhizal associations in Cistaceae from a maritime pine forest: ecological and biotechnological approach," Dissertação de Mestrado, Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2016.
- [70] P. Ortega-Martínez, B. Águeda, L. M. Fernández-Toirán, and F. Martínez-Peña, "Tree age

influences on the development of edible ectomycorrhizal fungi sporocarps in *Pinus sylvestris* stands," *Mycorrhiza*, vol. 21, no. 1, pp. 65–70, 2011.

- [71] J. Dighton and P. Mason, "Mycorrhizal dynamics during forest tree development," in *Developmental biology of higher fungi*, 1st Ed., D. Moore, L. A. Casselton, D. A. Wood, and J. C. Frankland, Eds. Cambridge: Cambridge University Press, 1985, pp. 117–139.
- [72] C. S. Rao, G. D. Sharma, and A. K. Shukla, "Distribution of ectomycorrhizal fungi in pure stands of different age groups of *Pinus kesiya*," *Can. J. Microbiol.*, vol. 43, no. 1, pp. 85–91, 1997.
- [73] P. B. Flegg, D. M. Spencer, and D. A. Wood, *The Biology and technology of the cultivated mushroom*, First Edition. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Inc, 1985.
- [74] E. Mohammadi Goltapeh, Y. Rezaee Danesh, R. Prasad, and A. Varma, *Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics*, 3rd Ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008.
- [75] B. J. Piculell, J. D. Hoeksema, and J. N. Thompson, "Interactions of biotic and abiotic environmental factors in an ectomycorrhizal symbiosis, and the potential for selection mosaics," *BMC Biol.*, vol. 6, pp. 1–11, 2008.
- [76] T. A. Rigamonte, V. S. Pylro, and G. F. Duarte, "The role of mycorrhization helper bacteria in the establishment and action of ectomycorrhizae associations," *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 41, no. 4, pp. 832–840, 2010.
- [77] M. M. Garcia, M. Carvalheira, and J. Azevedo, "Contribuição para a caracterização da recolha comercial de macrofungos comestíveis no distrito de Bragança, Portugal," *An. da Assoc. Micológica A Pantorra*, pp. 141–153, 2006.
- [78] G. Moreno and J. L. Manjón, *Guía de hongos de la Península Ibérica*, 2nd Ed. Ediciones Omega, 2010.
- [79] C. Grangeia, S. A. Heleno, L. Barros, A. Martins, and I. C. F. R. Ferreira, "Effects of trophism on nutritional and nutraceutical potential of wild edible mushrooms," *Food Res. Int.*, vol. 44, no. 4, pp. 1029–1035, 2011.
- [80] W. Ciesla, *Non-wood forest products from temperate broad-leaved trees*. FAO, 2002.
- [81] S. Buczacki, *Collins Fungi Guide*, 1st Ed. HarperCollins Publishers, 2012.
- [82] X. Lu, N. Malajczuk, and B. Dell, "Mycorrhiza formation and growth of *Eucalyptus globulus* seedlings inoculated with spores of various ectomycorrhizal fungi," *Mycorrhiza*, vol. 8, no. 2, pp. 81–86, 1998.
- [83] R. Singer, *The Agaricales in modern taxonomy*, 4th Ed. Koeltz Scientific Books, Koenigstein, 1986.
- [84] R. Bedry *et al.*, "Wild-Mushroom Intoxication as a Cause of Rhabdomyolysis," *N. Engl. J. Med.*, vol. 345, no. 11, pp. 798–802, 2001.
- [85] B. E. Lechner and E. Albertó, "Especies tóxicas de Agaricales halladas en la Argentina: nueva cita de *Amanita pantherina* y reevaluación de la comestibilidad de *Tricholoma equestre*," *Bol. Soc. Argent. Bot.*, vol. 43, no. 3–4, pp. 227–235, 2008.
- [86] A. Yamada, H. Kobayashi, T. Ogura, and M. Fukada, "Sustainable fruit-body formation of edible mycorrhizal *Tricholoma* species for 3 years in open pot culture with pine seedling

- hosts," *Mycoscience*, vol. 48, no. 2, pp. 104–108, 2007.
- [87] I. C. F. R. Ferreira, P. Baptista, M. Vilas-Boas, and L. Barros, "Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity," *Food Chem.*, vol. 100, no. 4, pp. 1511–1516, 2007.
- [88] R. N. Cromer, "Silviculture of eucalypt plantations in Australia.," in *Nutrition of eucalypts*, CSIRO Publishing, 1996, pp. 259–273.
- [89] E. Goes, "Os Eucaliptos. Identificação e Monografia de 121 Espécies Existentes em Portugal.," *Portucel*, p. 372, 1985.
- [90] E. Goes, "Os Eucaliptos (Ecologia, Cultura, Produções e Rentabilidade)," *Portucel*, p. 366, 1977.
- [91] ICNF, *IFN6 – Áreas dos usos do solo e das espécies florestais de Portugal continental. Resultados preliminares*. Lisboa, 2013.
- [92] J. Paiva, "As plantações de eucaliptos e a flora e fauna portuguesa," *Cad. da Área Ciências Biológicas. Semin. Estud. Galego*, vol. 4, pp. 71–84, 1992.
- [93] A. Afonso, "O Eucalipto e a economia regional. As certezas e as dúvidas.," In: *Eucalipto. Economia e Território. SPER. Ed. Cosmos. Lisboa*, pp. 109–115, 1994.
- [94] M. Radich and A. Alves, "Dois Séculos da Floresta em Portugal," *Celva*, Lisboa, p. 226, 2000.
- [95] A. Song, Y. Wang, and Y. Liu, "Study on the chemical constituents of the essential oil of the leaves of *Eucalyptus globulus* Labill from China," *Asian J. Tradit. Med.*, vol. 4, no. 4, pp. 134–140, 2009.
- [96] "National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=2758, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2758> (accessed Jan. 14, 2018)." .
- [97] D. de Almeida, L. C. Marchini, G. da S. Sodr e, M. D'Ávila, and C. M. F. de Arruda, *Plantas Visitadas por Abelhas e Polinização*, Special Edition. Piracicaba: Serviço de Produções Gráficas – USP/ESALQ, 2003.
- [98] G. Chilvers and L. Pryor, "The structure of eucalypt mycorrhizas," *Aust. J. Bot.*, vol. 13, no. 2, pp. 245–259, 1965.
- [99] S. M. Dabney, J. A. Delgado, and D. W. Reeves, "Using winter cover crops to improve soil and water quality," *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, vol. 32, no. 7–8, pp. 1221–1250, 2001.
- [100] K. Burri, C. Gromke, and F. Graf, "Mycorrhizal fungi protect the soil from wind erosion: A wind tunnel study," *L. Degrad. Dev.*, vol. 24, no. 4, pp. 385–392, 2013.
- [101] K. M. Dulmer, S. D. LeDuc, and T. R. Horton, "Ectomycorrhizal inoculum potential of northeastern US forest soils for American chestnut restoration: Results from field and laboratory bioassays," *Mycorrhiza*, vol. 24, no. 1, pp. 65–74, 2014.
- [102] X. Lu, N. Malajczuk, M. Brundrett, and B. Dell, "Fruiting of putative ectomycorrhizal fungi under blue gum ( *Eucalyptus globulus* ) plantations of different ages in Western Australia," *Mycorrhiza*, vol. 8, no. May 2014, pp. 255–261, 1999.
- [103] M. Machado, "La mycorrhization contrôlée d'*Eucalyptus globulus* au Portugal et l'effet de la sécheresse sur la symbiose ectomycorrhizienne chez cette essence," Université Henry Poincaré-Nancy, 1995.

- [104] M. Pestaña Nieto and S. Santolamazza Carbone, "Characterization of juvenile maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) ectomycorrhizal fungal community using morphotyping, direct sequencing and fruitbodies sampling," *Mycorrhiza*, vol. 19, no. 2, pp. 91–98, 2009.
- [105] I. A. Dickie and P. B. Reich, "Ectomycorrhizal fungal communities at forest edges," *J. Ecol.*, vol. 93, no. 2, pp. 244–255, 2005.
- [106] R. Agerer, *1987-1998 Colour Atlas of Ectomycorrhizae*, 1st Ed. Munchen, Germany: Einhorn-Verlag, Schwäbisch Gmünd, 1989.
- [107] T. J. White, T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor, "Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes For Phylogenetics," in *PCR Protocols*, M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, Eds. London: Academic Press, 1990, pp. 315–322.
- [108] M. Gardes and T. D. Bruns, "Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above- and below-ground views," *Can. J. Bot.*, vol. 74, no. 10, pp. 1572–1583, 1996.
- [109] R. Agerer and G. Rambold, "2004–2018 [first posted on 2004-06-01; most recent update: 2011-01-10]. DEEMY – An Information System for Characterization and Determination of Ectomycorrhizae.," *München, Germany*, 2004. .
- [110] S. Rossi, T. Anfodillo, and R. Menardi, "Trepbor: A new tool for sampling microcores from tree stems," *IAWA J.*, vol. 27, no. 1, pp. 89–97, 2006.
- [111] K. Ingleby, P. A. Mason, F. T. Last, and L. V. Fleming, *Identification of ectomycorrhizas, Institute of Terrestrial Ecology (ITE)*. HMSO, London, 1990.
- [112] T. Murashige and F. Skoog, "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tohaoco Tissue Cultures," *Physiol. Plant*, vol. 15, no. 3, pp. 473–497, 1962.
- [113] C. A. Thanos and P. W. Rundel, "Fire-followers in chaparral: nitrogenous compounds trigger seed germination," *J. Ecol.*, vol. 83, no. 2, p. 207, 1995.
- [114] E. Marchante, "Avaliação da colonização ectomicorrízica em plantações experimentais de *Eucalyptus globulus* Labill. sujeitas a tratamentos de gestão de resíduos orgânicos e fertilização," *Dissertação de Mestrado, Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra*, 2002.
- [115] C. Albrecht, A. Asselin, Y. Piché, and F. Lapeyrie, "Chitinase activities are induced in *Eucalyptus globulus* roots by ectomycorrhizal or pathogenic fungi, during early colonization," *Physiol. Plant.*, vol. 91, no. 1, pp. 104–110, 1994.
- [116] M. M. Moser, *Die Gattung Phlegmacium (Schleimköpfe). Die Pilze Mitteleuropas 4*. Julius Klinkhardt, Bad Heilbrunn, 1960.
- [117] F. Sánchez, M. Honrubia, and P. Torres, "Effects of pH, water stress and temperature on in vitro cultures of ectomycorrhizal fungi from Mediterranean forests," *Cryptogam. Mycol.*, vol. 22, no. 4, pp. 243–258, 2001.
- [118] A. Daza, J. L. Manjón, M. Camacho, L. Romero de la Osa, A. Aguilar, and C. Santamaría, "Effect of carbon and nitrogen sources, pH and temperature on in vitro culture of several isolates of *Amanita caesarea* (Scop.:Fr.) Pers.," *Mycorrhiza*, vol. 16, no. 2, pp. 133–136, 2006.
- [119] Beyhan Kibar, "Mycelial growth requirements of *Lactarius pyrogalus* and *Lactarius controversus*," *African J. Microbiol. Res.*, vol. 5, no. 28, pp. 5107–5114, 2011.

- [120] G. Nasim, S. H. Malik, R. Bajwa, M. Afzal, and S. W. Mian, "Effect of three different culture media on mycelial growth of oyster and chinese mushrooms," *J. Biol. Sci.*, vol. 1, no. 12, pp. 1130–1133, 2001.
- [121] R. Sanmee, P. Lumyong, B. Dell, and S. Lumyong, "In vitro cultivation and fruit body formation of the black bolete, *Phlebopus portentosus*, a popular edible ectomycorrhizal fungus in Thailand," *Mycoscience*, vol. 51, no. 1, pp. 15–22, 2010.
- [122] D. Fadel, S. Kintzios, A. S. Economou, G. Moschopoulou, and H.-I. A. Constantinidou, "Effect of Different Strength of Medium on Organogenesis, Phenolic Accumulation and Antioxidant Activity of Spearmint (*Mentha spicata* L.)," *Open Hort. J.*, vol. 3, no. 1, pp. 31–35, 2010.
- [123] C. C. Villamor Researcher, "Influence of media strength and sources of nitrogen on micropropagation of ginger, *Zingiber officinale* Rosc.," *E-International Sci. Res. J.*, vol. 2, no. 2, pp. 150–155, 2010.
- [124] M. Gryndler, "Soil traps as a tool for studies of underground mycelia of ectomycorrhizal fungi: a case study of *Tuber aestivum*," in *8th International Workshop on Edible Mycorrhizal Mushrooms, 6 TAUEG conference*, 2016, p. 29.
- [125] S. Banik and R. Nandi, "Effect of supplementation of rice straw with biogas residual slurry manure on the yield, protein and mineral contents of oyster mushroom," *Ind. Crops Prod.*, vol. 20, no. 3, pp. 311–319, 2004.
- [126] R. Zhang, X. Li, and J. . Fadel, "Oyster mushroom cultivation with rice and wheat straw," *Bioresour. Technol.*, vol. 82, no. 3, pp. 277–284, 2002.
- [127] M. Bonatti, P. Karnopp, H. . Soares, and S. . Furlan, "Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes," *Food Chem.*, vol. 88, no. 3, pp. 425–428, 2004.
- [128] M. C. N. de Andrade, D. C. Zied, M. T. de A. Minihoni, and J. Kopytowski Filho, "Yield of four *Agaricus bisporus* strains in three compost formulations and chemical composition analyses of the mushrooms," *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 39, no. 3, pp. 593–598, 2008.
- [129] Y. I. Kim, W. M. Cho, S. K. Hong, Y. K. Oh, and W. S. Kwak, "Yield, Nutrient Characteristics, Ruminant Solubility and Degradability of Spent Mushroom (*Agaricus bisporus*) Substrates for Ruminants," *Asian-Australasian J. Anim. Sci.*, vol. 24, no. 11, pp. 1560–1568, 2011.
- [130] P. Stamets, *Mycelium running: How mushrooms can help save the world*, 1st Ed. Berkeley, United States: Random House USA Inc, 2005.
- [131] T. J. Harrington and D. T. Mitchell, "Characterization of *Dryas octopetala* ectomycorrhizas from limestone karst vegetation, western Ireland," *Can. J. Bot.*, vol. 80, no. 9, pp. 970–982, 2002.
- [132] R. Agerer, H. Kraigher, and B. Javornik, "Identification of ectomycorrhizae of *Hydnum rufescens* on Norway spruce and the variability of the ITS region of *Hydnum rufescens* and *H. repandum* (Basidiomycetes)," *Nov. Hedwigia*, vol. 63, no. 1–2, pp. 183–194, 1996.
- [133] T. Grebenc, M. P. Martín, and H. Kraigher, "Ribosomal ITS diversity among the European species of the genus *Hydnum* (Hydnaceae)," *An. del Jardín Botánico Madrid*, vol. 66, no. 1, pp. 121–132, 2009.
- [134] A. Peksen, B. Kibar, and G. Yakupoglu, "Favourable culture conditions for mycelial growth of *Hydnum repandum*, a medicinal mushroom," African Networks on Ethnomedicines,

2013.

- [135] D. Minerdi, R. Fani, R. Gallo, A. Boarino, and P. Bonfante, "Nitrogen fixation genes in an endosymbiotic Burkholderia strain.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, no. 2, pp. 725–32, Feb. 2001.
- [136] Y. Liang, H. Chen, M. Tang, and S. Shen, "Proteome analysis of an ectomycorrhizal fungus *Boletus edulis* under salt shock," *Mycol. Res.*, vol. 111, no. 8, pp. 939–946, 2007.
- [137] D. Smith and A. H. S. Onions, *The preservation and maintenance of living fungi*, 2nd Ed. Wallingford, UK: CAB INTERNATIONAL, 1994.
- [138] G. C. Paul and C. R. Thomas, "Characterisation of mycelial morphology using image analysis," in *Biotechnology of Aroma Compounds (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology)*, 1st Ed., T. Scheper, Ed. Springer, 1996, pp. 1–59.
- [139] F.-C. Yang and C.-B. Liao, "Effects of cultivating conditions on the mycelial growth of *Ganoderma lucidum* in submerged flask cultures," *Bioprocess Eng.*, vol. 19, no. 3, pp. 233–236, 1998.
- [140] A. Martins, "In Vitro Mycorrhization of Micropropagated Plants: Studies on *Castanea sativa* Mill.," in *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*, 1st Ed., Springer, 2008, pp. 319–334.
- [141] Y. L. Chen, L. H. Kang, N. Malajczuk, and B. Dell, "Selecting ectomycorrhizal fungi for inoculating plantations in south China: Effect of *Scleroderma* on colonization and growth of exotic *Eucalyptus globulus*, *E. urophylla*, *Pinus elliottii*, and *P. radiata*," *Mycorrhiza*, vol. 16, no. 4, pp. 251–259, 2006.
- [142] Y. L. Chen, B. Dell, and N. Malajczuk, "Effect of *Scleroderma* Spore Density and Age on Mycorrhiza Formation and Growth of Containerized *Eucalyptus globulus* and *E. urophylla* Seedlings," *New For.*, vol. 31, no. 3, pp. 453–467, 2006.
- [143] B. Dell, N. Malajczuk, N. L. Bougher, and G. Thomson, "Development and function of *Pisolithus* and *Scleroderma* ectomycorrhizas formed in vivo with *Allocasuarina*, *Casuarina* and *Eucalyptus*," *Mycorrhiza*, vol. 5, no. 2, pp. 129–138, 1994.
- [144] N. Malajczuk, F. Lapeyrie, and J. Garbaye, "Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* on roots of *Eucalyptus urophylla* in vitro. 1. Mycorrhiza formation in model systems," *New Phytol.*, vol. 114, no. 4, pp. 627–631, 1990.
- [145] M. Brundrett, N. Malajczuk, G. Mingqin, X. Daping, S. Snelling, and B. Dell, "Nursery inoculation of *Eucalyptus* seedlings in Western Australia and Southern China using spores and mycelial inoculum of diverse ectomycorrhizal fungi from different climatic regions," *For. Ecol. Manage.*, vol. 209, no. 3, pp. 193–205, 2005.
- [146] W. A. Dunstan, N. Malajczuk, and B. Dell, "Effects of bacteria on mycorrhizal development and growth of container grown *Eucalyptus diversicolor* F. Muell. seedlings," *Plant Soil*, vol. 201, no. 2, pp. 241–249, 1998.
- [147] J. M. Trappe, "Selection of Fungi for Ectomycorrhizal Inoculation in Nurseries," *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 15, no. 1, pp. 203–222, 1977.
- [148] G. A. Chilvers, P. A. Douglass, and F. F. Lapeyrie, "A Paper-Sandwich Technique for Rapid Synthesis of Ectomycorrhizas," *New Phytol.*, vol. 103, no. 2, pp. 397–402, 1986.
- [149] D. P. Horan, G. A. Chilvers, and F. F. Lapeyrie, "Time sequence of the infection process eucalypt ectomycorrhizas," *New Phytol.*, vol. 109, no. 4, pp. 451–458, 1988.

- [150] P. A. Mason, K. Ingleby, R. C. Munro, J. Wilson, and K. Ibrahim, "Interactions of nitrogen and phosphorus on mycorrhizal development and shoot growth of *Eucalyptus globulus* (Labill.) seedlings inoculated with two different ectomycorrhizal fungi," *For. Ecol. Manage.*, vol. 128, no. 3, pp. 259–268, 2000.
- [151] S. G. Jonathan, I. O. Fasidi, and E. J. Ajayi, "Physico-Chemical studies on *Volvariella esculenta* (Mass) Singer, a Nigerian edible fungus," *Food Chem.*, vol. 85, no. 3, pp. 339–342, 2004.
- [152] D. H. Marx, W. C. Bryan, and C. B. Davey, "Influence of Temperature on Aseptic Synthesis of Ectomycorrhizae by *Thelephora terrestris* and *Pisolithus tinctorius* on Loblolly Pine," *For. Sci.*, vol. 16, no. 4, pp. 424–431, 1970.
- [153] F. Vardar and M. D. Lilly, "Effect of cycling dissolved oxygen concentrations on product formation in penicillin fermentations," *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 14, no. 4, pp. 203–211, 1982.
- [154] E. V. Emelyanova, "Effects of cultivation conditions on the growth of the basidiomycete *Coriolus hirsutus* in a medium with pentose wood hydrolyzate," *Process Biochem.*, vol. 40, no. 3–4, pp. 1119–1124, 2005.
- [155] R. Tinoco, M. A. Pickard, and R. Vazquez-Duhalt, "Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 32, no. 5, pp. 331–335, 2001.
- [156] H. O. Stanley and G. D. Awi-Waadu, "Effect of substrates of spawn production on mycelial growth of Oyster mushroom species," *Res. J. Appl. Sci.*, vol. 5, no. 3, pp. 161–164, 2010.
- [157] B. Elhami and N. A. Ansari, "Effect of Substrates of Spawn Production on Mycelium Growth of Oyster Mushroom Species," *J. Biol. Sci.*, vol. 8, no. 2, pp. 474–477, 2008.
- [158] H. Mehravarar, *Principles of Fungi*. UK: Urmiah University Publication, 1993.
- [159] A. Philippoussis, G. Zervakis, and P. Diamantopoulou, "Bioconversion of agricultural lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible mushrooms *Agrocybe aegerita*, *Volvariella volvacea* and *Pleurotus* spp.," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 17, no. 2, pp. 191–200, 2001.
- [160] C. S. Maki and L. D. Paccola-meirelles, "Characterization and cultivation of a wild mushroom species isolated in Brazil," *Biologia (Bratisl.)*, vol. 23, no. 1, pp. 77–82, 2002.
- [161] T. W. Felgel, "Development of Parasol Mushroom (*Macrolepiota*) Culture for Commercial Scale," National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), The Project Final Report, 2002.
- [162] V. P. Sharma, S. Kumar, and M. P. Sagar, "Annual Report 2007-2008," National Research Centre for Mushroom, Indian Council of Agricultural Research, 2008.
- [163] M. N. Owaid, A. M. Abed, and B. M. Nassar, "Recycling cardboard wastes to produce blue oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* in Iraq," *Emirates J. Food Agric.*, vol. 27, no. 7, pp. 537–541, 2015.
- [164] L. E. Hawker, "British Hypogeous Fungi," *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 237, no. 650, pp. 429–546, 1954.
- [165] M. S. Reddy and Z. A. Patrick, "Effect of bacteria associated with mushroom compost and casing materials on basidiomata formation in *Agaricus bisporus*," *Can. J. Plant Pathol.*, vol. 12, no. 3, pp. 236–242, Sep. 1990.



- [166] G. Eger, "Experiments and comments on the action of bacteria on sporophore initiation in *Agaricus bisporus*," *Mushroom Sci.*, vol. 8, pp. 719–725, 1972.
- [167] W. A. Hayes, "Interrelated studies of physical, chemical and biological factors in casing soils and relationships with productivity in commercial culture of *Agaricus bisporus* Lange (Pilati)," *Mushroom Sci.*, vol. 11, pp. 103–129, 1981.
- [168] H. R. Visscher, "Fructification of *Agaricus bisporus* (Lge.) Imb. in relation to the relevant microflora in the casing soil," *Mushroom Sci.*, vol. 10, pp. 641–664, 1979.
- [169] M. T. Madigan, K. S. Bender, D. H. Buckley, W. M. Sattley, and D. A. Stahl, *Brock Biology of Microorganisms*, 15th Ed. Pearson, 2017.
- [170] A. Thawthong *et al.*, "Discovering and domesticating wild tropical cultivatable mushrooms," *Chiang Mai J. Sci.*, vol. 41, no. 4, pp. 731–764, 2014.