



¹ Escola Superior Agrária de Bragança, Campus de Sta. Apolónia, 5301-855 Bragança, Portugal. pbaptista@ipb.pt

² Departamento de Biologia/Centro de Biologia, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal



Introdução

O castanheiro (*Castanea sativa*) estabelece associação com numerosas espécies de fungos ectomicorrízicos, estando descritos os efeitos benéficos para a planta após micorrização com *Pisolithus tinctorius*. Apesar da reconhecida importância da micorrização, a natureza molecular dos sinais emitidos bem como os mecanismos de reconhecimento e interação dos parceiros simbióticos encontram-se por esclarecer.

Objectivos

Neste trabalho pretendeu-se avaliar a sinalização entre raízes de castanheiro - fungo ectomicorrízico nas fases iniciais da micorrização. A capacidade estimuladora/inibidora no crescimento de *P. tinctorius* (*Pt*) foi determinada pela utilização de extractos de raízes eliciadas em diferentes tempos de contacto com *Pt* (0-48 horas), em condições *in vitro*.

Material e Métodos

Obtenção de plântulas de *C. sativa*



Crescimento em sistema hidropónico das sementes pré-germinadas (em areia) em condições estéreis

Inoculação de plântulas de *C. sativa*

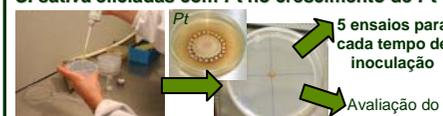


Crescimento de *Pt* em meio Melin-Norkans (MMN) Inoculação das plântulas com *P. tinctorius*

Amostragem

Nos diferentes tempos de contacto raiz-fungo foram recolhidas 15 plantas que se subdividiram em 3 grupos (5 plantas cada). Os extractos foram preparados por homogeneização em tampão de extracção (pH 7), de acordo com Baptista *et al.* (2007). Os extractos foram aferidos para uma mesma concentração (240 µg/ml)

Efeito do extracto proteico de raízes de *C. sativa* eliciadas com *Pt* no crescimento de *Pt*



Aplicação de 24 µg de proteína extraída de raízes eliciadas em meio MMN Inoculação com *Pt* 5 ensaios para cada tempo de inoculação Avaliação do crescimento radial ao longo de 30 dias

Resultados

Crescimento de *P. tinctorius* em meio MMN complementado com extractos radiculares de *C. sativa* eliciado com *P. tinctorius*

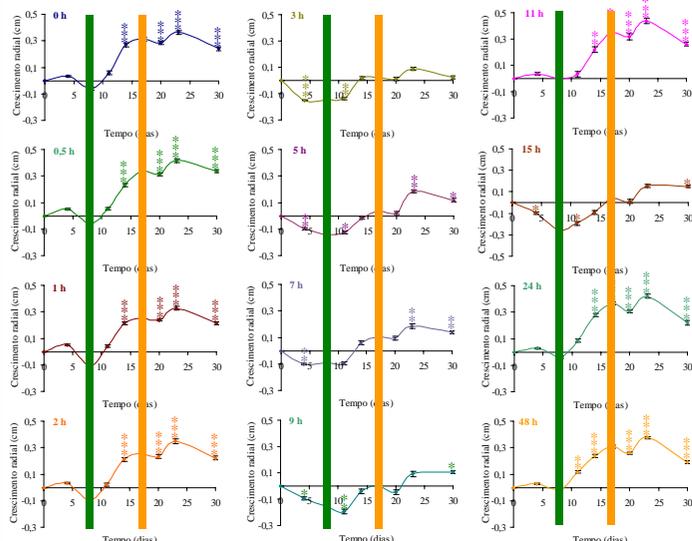


Fig. 1 - Crescimento radial relativo (diferença entre o crescimento radial de *Pt* a crescer em meio MMN, na presença de extracto proteico de raízes de *C. sativa* eliciadas e de *Pt* a crescer em meio MMN na presença de tampão de extracção). Foram utilizados extractos proteicos de raízes eliciadas, após diferentes tempos de contacto raiz-fungo (0-48 h), os quais aparecem indicados no respectivo gráfico. A barra indica média±ep (n=5). A existência de diferenças estatísticas relativamente ao controlo, para o mesmo tempo de inoculação, é indicada por * para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$; *** para $p < 0,001$.

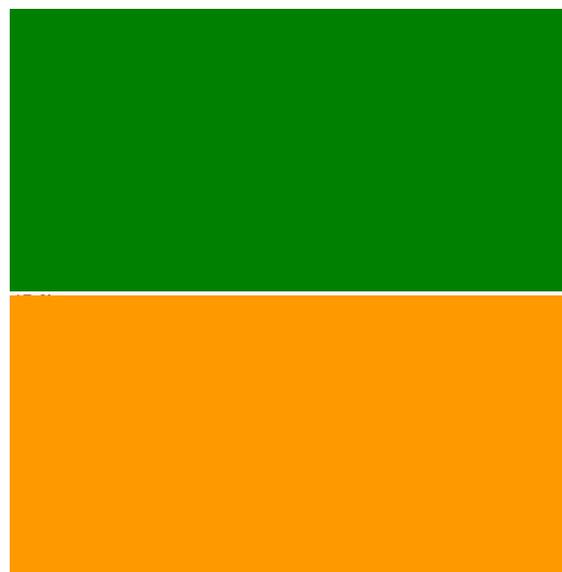


Fig. 2 - Crescimento radial de *Pt*, determinado ao fim de 8 e 17 dias de incubação em meio MMN complementado com extractos proteicos radiculares de *C. sativa* eliciadas com *Pt* (0-48 h). Como controlo foi utilizado meio MMN contendo tampão de extracção (linha a tracejado). A barra indica média±ep (n=5). Valores com a mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de $p < 0,05$.

A presença de extractos proteicos radiculares de *C. sativa* eliciados com *Pt*, sobretudo ao fim de 3 a 9 e 15 horas, inibem o crescimento deste fungo nos primeiros 8 dias de cultura.

A partir dos 17 dias de cultura, verifica-se um aumento do estímulo de crescimento de *Pt*, sobretudo em extractos proteicos radiculares eliciados ao fim de 2, 11 e a partir das 24 horas.

Conclusões

1. Extractos de raízes de castanheiro nos estádios iniciais de contacto com *Pt*, parecem regular o crescimento do fungo ectomicorrízico (ECM);
2. A inibição no crescimento de *Pt* observado nos primeiros 8 dias de cultura sugere que a planta, após o reconhecimento de um determinado fungo compatível e enquanto é estabelecida a simbiose ectomicorrízica, inibe o crescimento de outros fungos;
3. Dado que o efeito inibitório é apenas registado em raízes após 3 horas de elicitação, parece ser este o tempo necessário para a percepção, transdução de sinal e expressão de genes envolvidos na regulação do crescimento do fungo ECM

Análise macroscópica de *Pt* na presença de extractos proteicos de raízes sujeitas a diferentes tempos de contacto com *Pt*

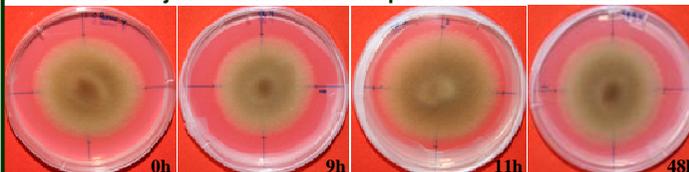


Fig. 3 - Aspecto macroscópico de *Pt*, 23 dias após inoculação, em meio de cultura MMN contendo extractos proteicos radiculares de plântulas de *C. sativa*. Cada placa corresponde a um extracto proteico de raízes de castanheiro eliciadas, sendo indicado o período de tempo de interação com *Pt* a que se refere.

A análise macroscópica de *Pt*, crescido na presença de extractos radiculares de plântulas de castanheiro eliciadas por *Pt* ou tampão de extracção (controlo) não evidenciou diferenças

4. Este efeito inibitório pode ser o resultado da produção de alguns compostos em consequência da inoculação com *Pt*, deixando de ser observado a partir dos 14 dias de ensaio provavelmente devido à sua degradação e/ou inactivação por parte do fungo cultivado