



**ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA**  
INSTITUTO POLITÉCNICO DE CASTELO BRANCO

**Criopreservação de fungos ectomicorrízicos:  
efeitos na fidelidade genética e na capacidade de  
associação em germinantes de *Pinus sylvestris* L.**

**Engenharia Florestal**  
**Relatório do Trabalho de Fim de Curso**

**Catarina Silva Ideia Rainha Estevão**



**CASTELO BRANCO**  
**2001**

## ÍNDICE

<b>I.</b>	<b><i>Agradecimentos</i></b>	<b><i>iv</i></b>
<b>II.</b>	<b><i>Abreviaturas</i></b>	<b><i>vi</i></b>
<b>III.</b>	<b><i>Resumo e palavras chave</i></b>	<b><i>vii</i></b>
<b>IV.</b>	<b><i>Abstract and key-words</i></b>	<b><i>viii</i></b>
<b>V.</b>	<b><i>Índice</i></b>	<b><i>ix</i></b>
<b>NOTA PRÉVIA</b>		<b><i>xii</i></b>
<b>I. INTRODUÇÃO</b>		<b>1</b>
<hr/>		
<b>1.</b>	<b>PINHEIRO SILVESTRE</b>	<b>2</b>
1.1	<i>Generalidades</i>	2
1.2	<i>Caracterização botânica</i>	3
1.3	<i>Importância económica</i>	5
1.4	<i>Propagação vegetativa</i>	6
1.4.1	Micropropagação	6
1.4.2	O enraizamento e a aplicação de micorrizas	8
<b>2.</b>	<b>MICORRIZAS</b>	<b>9</b>
2.1	<i>Importância ecológica</i>	9
2.2	<i>Classificação e características gerais</i>	10
2.3	<i>Ectomicorrizas</i>	11
2.3.1	Estrutura versus função	12
2.3.2	Espécies em associação simbiótica com o pinheiro silvestre	12
2.3.3	Inter-relação entre o pinheiro silvestre e as espécies ectomicorrízicas	15
2.3.3.1	Desenvolvimento radicular	15
2.3.3.2	Desenvolvimento micorrízico	16
2.3.3.2.1	Iniciação e formação do manto	16
2.3.3.2.2	Penetração do fungo e formação da rede de Hartig	17
2.3.4	Efeitos da inoculação micorrízica no crescimento e desenvolvimento do pinheiro silvestre	18
2.3.5	Preservação e manutenção das características metabólicas	18

<b>3. CRIOPRESERVAÇÃO</b>	19
3.1 <i>Princípios básicos da criopreservação</i>	20
3.2 <i>Factores que condicionam a criopreservação</i>	21
3.2.1 <i>Crioprotectores</i>	21
3.3 <i>Métodos utilizados</i>	22
3.3.1 <i>Arrefecimento lento</i>	22
3.3.2 <i>Vitrificação</i>	23
3.3.3 <i>Descongelamento, regeneração, sobrevivência e estabilidade genética</i>	24
3.4 <i>Vantagens e desvantagens da aplicação da criopreservação</i>	25
3.5 <i>A criopreservação dos fungos</i>	25
<b>4. OBJECTIVOS DO TRABALHO</b>	26
<b>II. MATERIAL E MÉTODOS DE CULTURA</b>	27
<hr/>	
<b>1. MATERIAL BIOLÓGICO E CONDIÇÕES DE CULTURA</b>	28
1.1 <i>Estirpes ectomicorrízicas</i>	28
1.2 <i>Sementes de pinheiro silvestre</i>	28
<b>2. METODOLOGIA</b>	29
2.1 <i>Protocolos de criopreservação</i>	29
2.2 <i>Inoculação micorrízica</i>	32
2.3 <i>Fidelidade genética</i>	33
<b>3. PARÂMETROS QUANTIFICADORES</b>	36
3.1 <i>Análise de crescimento</i>	36
3.2 <i>Histologia e anatomia radicular</i>	37
<b>4. DELINEAMENTO E TRATAMENTO ESTATÍSTICO</b>	38

<b>III. RESULTADOS</b>	39
<b>1. CRIOPRESERVAÇÃO</b>	40
1.1 <i>Taxa de sobrevivência</i>	40
1.2 <i>Crescimento total do micélio</i>	41
<b>2. FIDELIDADE GENÉTICA</b>	43
2.1 <i>Análise de DNA</i>	43
<b>3. INOCULAÇÕES ECTOMICORRÍZICAS</b>	44
3.1 <i>Comprimento total e peso fresco da raiz principal</i>	44
3.2 <i>Percentagem de micorrizas</i>	47
3.3 <i>Histologia e anatomia radicular</i>	48
3.3.1 <i>Associação e desenvolvimento micorrízico</i>	48
<b>IV. DISCUSSÃO</b>	51
4.1 <i>Criopreservação</i>	52
4.2 <i>Micorrização</i>	57
<b>V. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	61
<b>VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	64
<b>VII. ANEXOS</b>	74

## RESUMO

O presente trabalho teve como principal objectivo a criopreservação de fungos ectomicorrízicos analisando a sua influência na estabilidade genética das estirpes e na capacidade de associação com o *Pinus sylvestris*, germinado *in vitro*. Os seus efeitos foram avaliados com base na percentagem de sobrevivência, taxa de crescimento e análise de DNA das estirpes ectomicorrízicas e nos parâmetros de crescimento e anatomia radicular das microplantas de pinheiro silvestre.

Foram testadas 8 estirpes de 5 espécies de fungos ectomicorrízicos: *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch (**PTI**), *Paxillus involutus* (Batsch:Fr.) Fr. (**PiH PiO, PIK0**), *Suillus variegatus* (Sw. :Fr.) O. Kunze (**SVI e SVS**), *Laccaria bicolor* (Maire) Orton (**LBU**) e *Laccaria proxima* (Poud.) Pat (**LPL**). Estudaram-se dois métodos de criopreservação, arrefecimento lento com duas taxas de arrefecimento, 0,17 °C/min (Lauda) e 1 °C/min (Mr. Frost), e o método de vitrificação. O processo de criopreservação afectou a viabilidade das estirpes PTI, PiH, PiO, PiKo e LPL, mas as estirpes SVS e SVI sobreviveram ao tratamento de vitrificação e Lauda. Este último possibilitou também a sobrevivência da estirpe LBU. Com o tratamento de Mr. Frost as estirpes não sobreviveram. Ao nível da análise de DNA, os marcadores moleculares RAPD detectaram alterações genéticas na estirpe SVS, exposta aos agentes crioprotectores do método de vitrificação.

As inoculações micorrízicas após a criopreservação das estirpes, desenvolveram bons resultados ao nível do comprimento e do peso fresco da raiz principal, não superando contudo os valores obtidos em condições normais. Verificou-se também, que os tratamentos de criopreservação inibiram as estirpes de formarem simbiose com o pinheiro-silvestre. Os agentes crioprotectores, por outro lado, demonstraram activar essa capacidade na estirpe PiO e inibi-la na estirpe LBU. As estirpes SVI e PTI apresentaram as estruturas características dessa associação, manto e rede de Hartig, em condições normais e após exposição aos crioprotectores.

Palavras-chave: criopreservação, fidelidade genética, fungos ectomicorrízicos, micorrização, *Pinus sylvestris*.