

Micorrizas Arbusculares e Ectomicorrizas

1. Fundamentação Teórica

As micorrizas são associações simbióticas mutualistas entre fungos do solo e raízes de plantas, desempenhando um papel central na nutrição e desenvolvimento da planta e no funcionamento dos ecossistemas terrestres. Os dois principais grupos de micorrizas são as **micorrizas arbusculares (AM)** e as **ectomicorrizas (ECM)**, que diferem na sua estrutura, diversidade taxonômica e funcionamento ecológico, embora partilhem benefícios mútuos para ambos os simbioses. Consequentemente, estes são os dois grupos de micorrizas mais estudados em ecologia.

As micorrizas arbusculares (AM) são associações simbióticas entre fungos micorrízicos arbusculares (AMF), pertencentes ao grupo Glomeromycotina (antes classificados como Glomeromycota), e raízes de plantas terrestres, ocorrendo em mais de 80% das espécies vegetais. Nesta simbiose, o fungo coloniza o córtex radicular, formando estruturas especializadas como arbúsculos, responsáveis pela troca de nutrientes, e vesículas, associadas ao armazenamento de reservas. Em contrapartida, a planta fornece carbono derivado da fotossíntese ao fungo, enquanto este aumenta a eficiência de aquisição de fósforo, azoto e outros micronutrientes. A colonização radicular por AMF é altamente variável e depende de fatores como a disponibilidade de nutrientes no solo, a identidade do hospedeiro e a composição do consórcio fúngico. Os esporos de AMF representam estruturas de resistência e dispersão, mas não refletem necessariamente a atividade funcional da simbiose em raízes colonizadas.

As ectomicorrizas (ECM) são associações simbióticas entre fungos dos filos Basidiomycota e Ascomycota e raízes de plantas lenhosas, nomeadamente árvores florestais. Neste tipo de simbiose, o fungo forma um manto fúngico externo e uma rede de Hartig intercelular, onde ocorre a transferência bidirecional de nutrientes entre os parceiros. Ao contrário das AM, as ECM não formam estruturas intracelulares como arbúsculos, ocorrendo a troca de nutrientes no espaço intercelular. As ECM desempenham um papel essencial nos ciclos do carbono e dos nutrientes em ecossistemas florestais, influenciando a produtividade, a estrutura e a estabilidade dos sistemas. A sua quantificação baseia-se principalmente na colonização radicular, uma vez que os esporos não constituem, na maioria dos casos, um indicador fiável da atividade funcional da simbiose.

A avaliação simultânea da colonização radicular, da abundância de estruturas de propagação (esporos) e da resposta da planta permite uma visão integrada da funcionalidade micorrízica. Nenhum destes indicadores, isoladamente, é suficiente para inferir o estado funcional do sistema simbiótico, sendo necessária uma abordagem integrativa.

2. Objetivos

Objetivo geral: Compreender a funcionalidade das micorrizas arbusculares (AM) e ectomicorrizas (ECM) através da integração de indicadores estruturais, de propagação e funcionais.

Objetivos específicos:

- Avaliar a colonização radicular por AMF e ECM como indicador de simbiose estabelecida
- Identificar estruturas funcionais da simbiose (arbúsculos, vesículas e rede de Hartig)
- Quantificar a abundância de esporos de AMF como indicador de potencial de propagação no solo (nota: este indicador aplica-se exclusivamente às micorrizas arbusculares)
- Avaliar a viabilidade metabólica dos esporos como indicador de qualidade funcional do inóculo (nota: este ensaio é exclusivo para AMF)
- Determinar o efeito da inoculação micorrízica na biomassa vegetal
- Integrar todos os indicadores para interpretar o estado funcional do sistema micorrízico

3. PRÉ-AULA – Estabelecimento da simbiose e preparação de amostras

Objetivo da fase pré-aula: garantir a formação de simbioses micorrízicas funcionais e a obtenção de amostras comparáveis para análise.

Nota: este protocolo distingue dois sistemas funcionais distintos: micorrizas arbusculares (AM) e ectomicorrizas (ECM), sendo analisados através de abordagens metodológicas diferentes.

3.1 Estabelecimento da simbiose planta–fungo

Procedimento

- Germinação de sementes de milho em condições controladas
- Transplante para vasos com substrato não estéril
- Aplicação de dois tratamentos:
 - AMF (+): inoculação com fungos micorrízicos arbusculares
 - Controlo (-): apenas inóculo nativo do solo
- Crescimento durante 6-8 semanas em condições controladas
- Fertilização com baixo fósforo para favorecer colonização micorrízica

Este sistema experimental corresponde exclusivamente à simbiose AMF.

3.2 Preparação de raízes para análise de colonização

Procedimento

- Colheita de raízes finas dos dois tratamentos
- Lavagem para remoção de partículas de solo
- Clarificação com KOH (10%)

- Acidificação com HCl (1%)
- Coloração com azul de tripano (0,05%)
- Conservação até análise

Estas raízes serão utilizadas para análise de colonização por AMF e, quando aplicável, avaliação morfológica de ECM em amostras específicas.

3.3 Preparação de amostras de solo para esporos AMF

Procedimento

- Recolha de solo rizosférico
- Armazenamento refrigerado
- Extração por peneiração húmida (wet sieving), centrifugação e gradiente de sacarose (ver na aula)
- Conservação dos esporos para contagem e ensaio de viabilidade

Este procedimento aplica-se exclusivamente às micorrizas arbusculares (AM).

3.4 Ensaio de viabilidade dos esporos de AMF (INT)

Procedimento

- Incubação de esporos de AMF com INT (2 mg mL⁻¹)
- Classificação por coloração

Este ensaio permite avaliar a atividade metabólica dos esporos de AMF, distinguindo potencial de propagação ativo e inativo.

4. Aula de 19 de maio

Observação e quantificação

Materiais

Para usar nos labs no 4º piso

- Microscópio ótico
- Lupa
- Lâminas preparadas de raízes
- Raízes micorrizadas
- Suspensões de esporos

Para observar e/ou usar no lab do 5º piso

- Plantas de milho inoculadas e não inoculadas
- Balança
- Crivos com diferentes malhas
- Cassetes para as raízes
- Solução de KOH, HCl, trypan blue (para o branqueamento e coloração)
- Centrífuga
- Solução de sacarose
- Solução de INT

4.1. IMPACTO DA INOCULAÇÃO MICORRÍZICA NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA VEGETAL

1. Pesar as raízes e as partes aéreas das plantas inoculadas e não inoculadas (pesar no lab do 5º piso).

4.2. MICORRIZAS ARBUSCULARES (AM)

A. Avaliação morfológica da colonização por AMF

2. Observar raízes coradas ao microscópio.
3. Identificar:
 - hifas
 - arbúsculos
 - vesículas

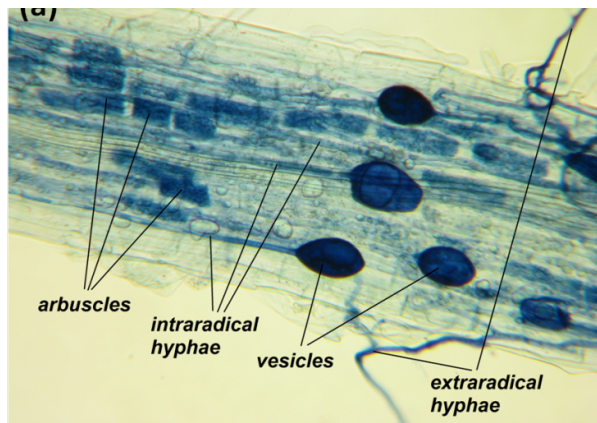
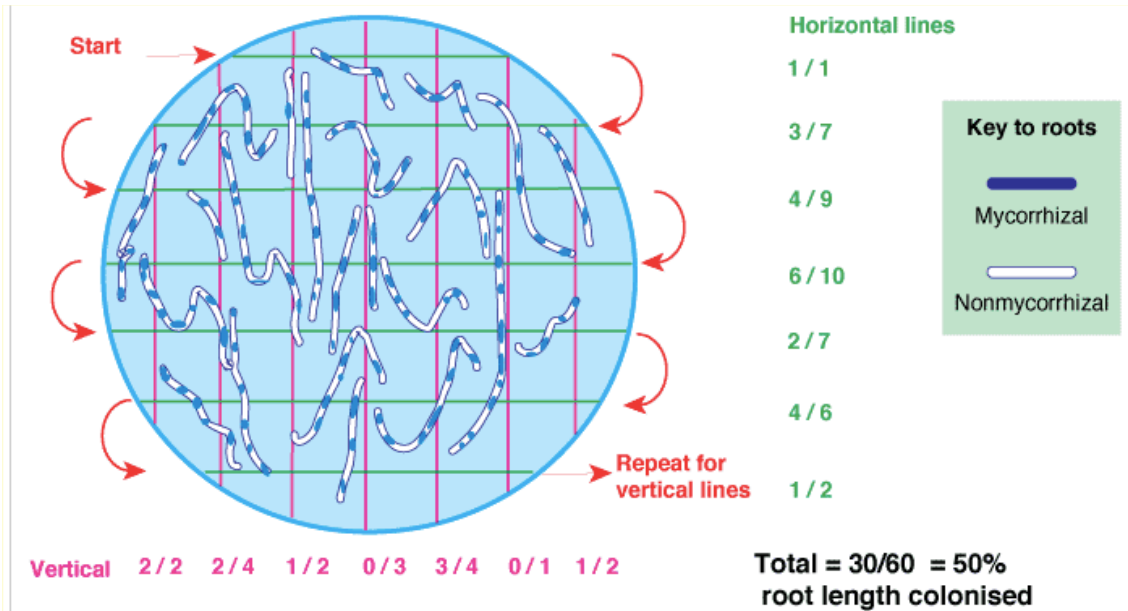


Figura 1 – exemplo de estruturas de AM observadas em raízes colonizadas e coradas com trypan blue (<https://mycorrhizas.info/vam.html>).

B. Quantificação da colonização radicular por AMF: intersecções em grelha

1. Na lupa, aplicar o método de intersecções (gridline – fig. 2)
2. Registrar pontos de intersecção com e sem colonização
4. Calcular a % de colonização



A gridline intersection example using a 8.5 cm diameter round Petri dish with a 1/2 inch (14/11 cm) grid, and a 1 m test sample of thread cut into fragments and randomly re-distributed 10 times (Figure 4.3 in Brundrett et al. 1996). Row and column totals are summarised in the table below.

Re-distribution	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Intersects (cm)	102	107	91	98	92	114	108	99	104	94
Average	100.9 cm ± 2.5 (standard error)									

Figura 2. Esquema da aplicação do método das intersecções em grelha para quantificar a colonização radicular por AMF (<https://mycorrhizas.info/method.html#em1>).

C. Quantificação de esporos de AMF e da sua viabilidade

1. Contar número de esporos “presos” no filtro, e distinguir esporos viáveis de não viáveis (ou seja, previamente foi realizado o ensaio com INT, em que os esporos foram incubados durante 72 h em solução de INT para avaliação de atividade metabólica):
 - Esporos viáveis e pouco viáveis: coloração vermelho/rosada (atividade desidrogenase).
 - Esporos não viáveis: ausência de coloração ou coloração residual fraca.
2. Expressar os dados por volume ou massa seca de solo (dependendo do dataset, vamos usar 100 g de solo, sendo que a **humidade do solo era de 70%**).

4.3. ECTOMICORRIZAS (ECM)

Nota: as ECM são avaliadas em material vegetal lenhoso (ex. raízes florestais previamente recolhidas), não sendo provenientes do sistema experimental de milho.

A. Quantificação da colonização radicular por ECM: intersecções em grelha

1. Na lupa, aplicar o método de intersecções (gridline – fig. 3)
2. Registrar pontos de intersecção com e sem colonização
3. Calcular a % de colonização

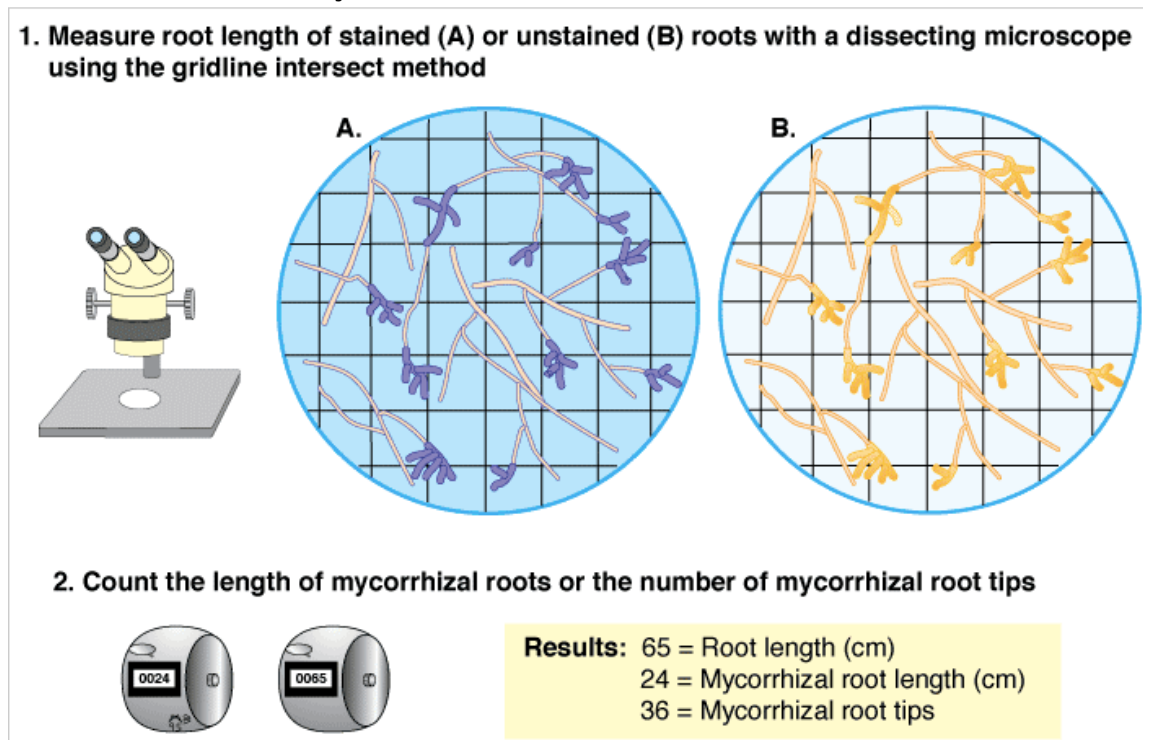


Figura 3. Esquema da aplicação do método das intersecções em grelha para quantificar a colonização radicular por ECM (<https://mycorrhizas.info/method.html#em1>).

5. Cálculos e análise

5.1 Percentagem de colonização (para AM e ECM)

Colonização (%) = $(n^{\circ} \text{ de intersecções colonizadas} / n^{\circ} \text{ total de intersecções}) \times 100$

5.2 Densidade e viabilidade de esporos (exclusivamente para AMF)

- esporos / g de solo ou
- esporos / mL de suspensão

6. Guião de discussão e análise crítica

Os estudantes podem analisar os resultados considerando os seguintes pontos:

A. Interpretação biológica

1. A colonização radicular reflete sempre maior eficiência simbiótica?
2. Porque pode existir desacoplamento entre colonização e densidade de esporos?
3. Que estruturas fúngicas são metabolicamente ativas na simbiose?
4. Qual o papel funcional dos arbúsculos e da rede de Hartig?
5. A biomassa vegetal correlaciona-se necessariamente com colonização?

B. Análise experimental

6. Limitações do método de interseções na quantificação de colonização.
7. Viés associado à coloração de raízes.
8. Vantagens e limitações da contagem de esporos como proxy de atividade micorrízica.
9. Representatividade espacial das amostras de solo.

C. Ecologia e funcionamento do ecossistema

10. Porque esporos podem ser abundantes sem colonização elevada?
11. Como a planta regula a colonização fúngica?
12. Influência de nutrientes do solo na simbiose.
13. Papel da diversidade fúngica na eficiência funcional.
14. Qual o impacto da viabilidade dos esporos (ensaio com INT) na interpretação da densidade de esporos como indicador funcional?
15. Pode existir elevada viabilidade dos esporos mas baixa colonização radicular? Que fatores do hospedeiro ou do ambiente podem explicar este desacoplamento?
16. Como se relacionam viabilidade, dormência e estratégias de sobrevivência/dispersão dos AMF?

D. Integração funcional

17. Qual indicador é mais fiável: colonização ou esporos?
18. Como integrar múltiplos indicadores para inferir funcionalidade?
19. Que outros parâmetros poderiam ser adicionados?

E. Modelo conceptual integrador

Para integrar os diferentes níveis de informação obtidos nesta aula, propõe-se o seguinte modelo conceptual:

- A **colonização radicular** representa a expressão funcional ativa da simbiose planta–fungo.
- A **densidade de esporos no solo** representa o potencial de dispersão e reserva do sistema fúngico, mas não necessariamente atividade funcional atual.
- A **viabilidade dos esporos** introduz uma dimensão metabólica adicional, distinguindo entre esporos ativos e não ativos.
- A **biomassa vegetal** reflete o desempenho fisiológico da planta e, indiretamente, o benefício funcional da simbiose.

7. Síntese Final

- Interpretar colonização em contexto funcional
- Relacionar indicadores estruturais e de propagação
- Avaliar limitações metodológicas
- Integrar biomassa com simbiose fúngica
- Discriminar claramente entre indicadores de AM e ECM

8. Sugestão de bibliografia

- Smith, S. E., & Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press.
- van der Heijden, M. G. A., et al. (2015). Mycorrhizal ecology and evolution. *New Phytologist*.
- Smith, S. E., & Smith, F. A. (2011). Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition. *Annual Review of Plant Biology*.
- Brundrett, M. C. (2008). Mycorrhizal associations: the coevolution of plants and fungi.
- Mahmoudi, N., Caeiro, M. F., Mahdhi, M., Tenreiro, R., Ulm, F., Mars, M., Cruz, C., & Dias, T. (2021). *Arbuscular mycorrhizal traits are good indicators of soil multifunctionality in drylands*. **Geoderma**, **397**, 115099