

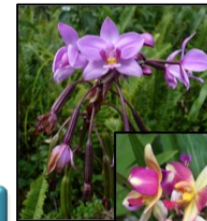
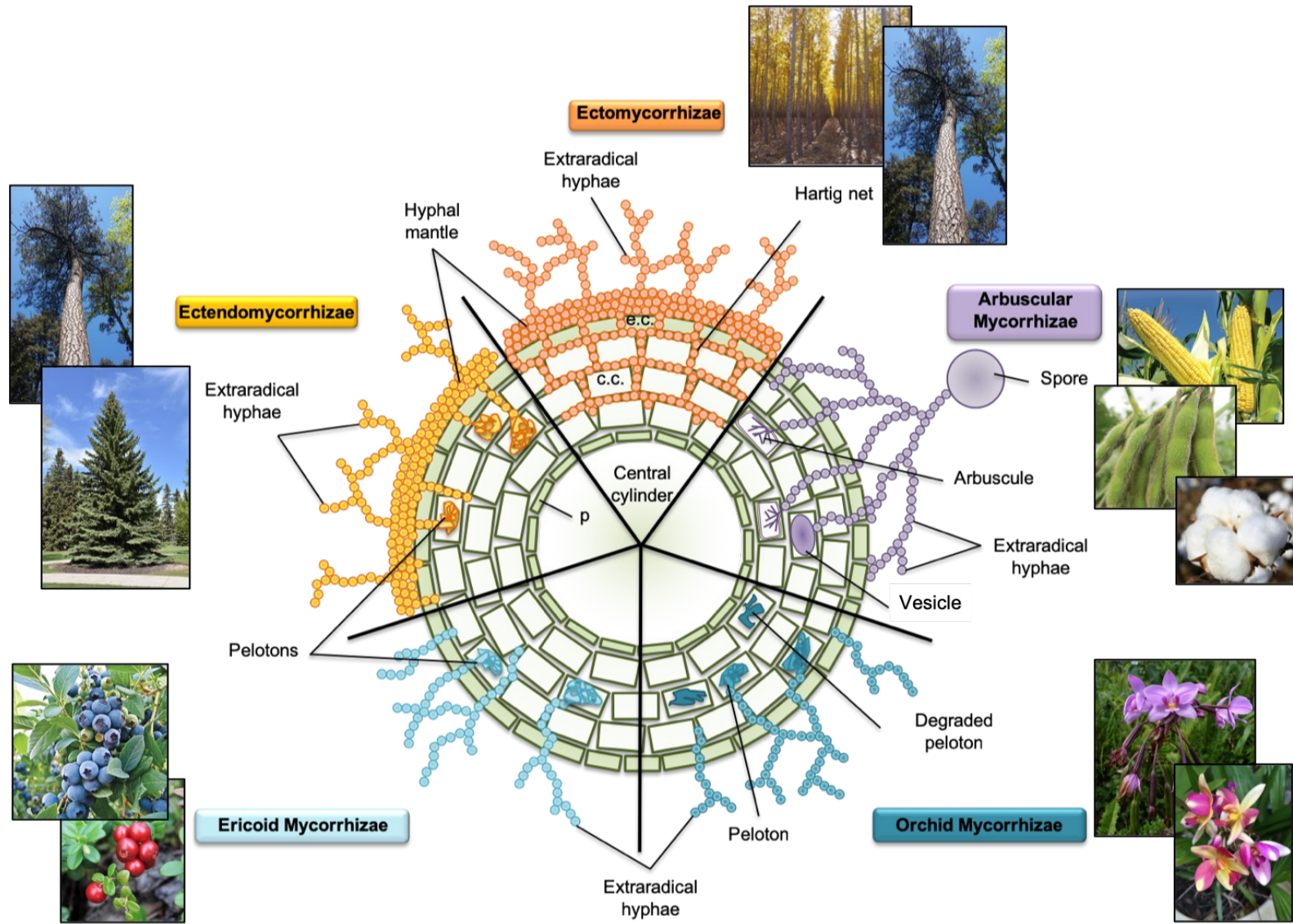
# Fungos micorrízicos e Micorrizas





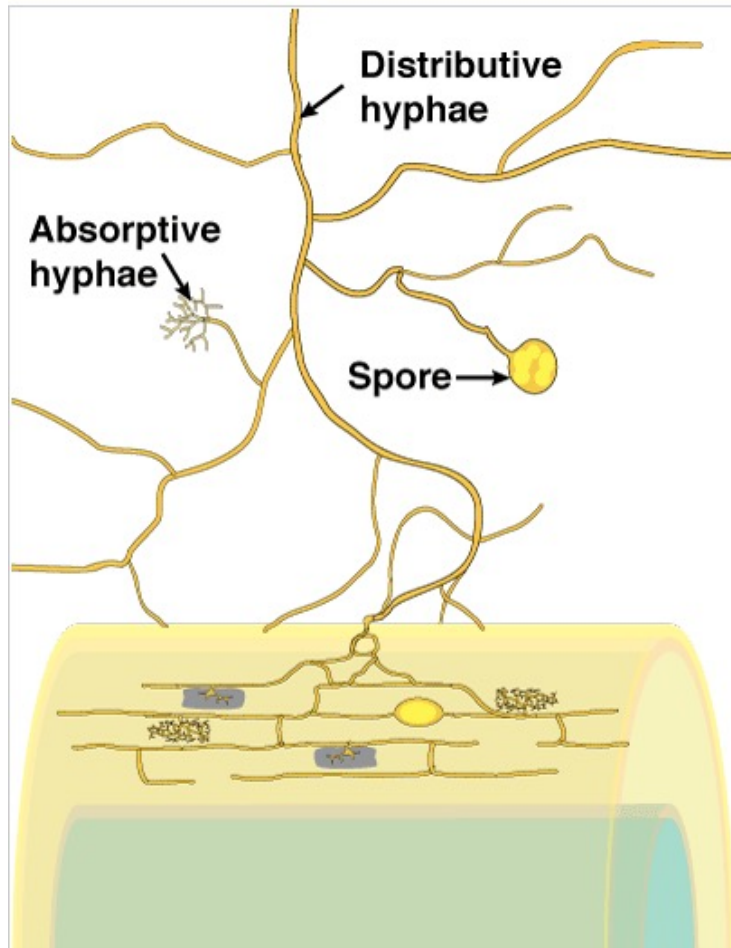
MYCORRHIZAL FUNGI:  
*THE ROOTS OF LIFE ON LAND*

<https://www.youtube.com/watch?v=0-hS4HoW5fM>



# Formação de AMF





### **A. Structures in Soil**

#### **Hyphae**

A network of hyphae forms in the soil with thicker hyphae which function as conduits.

#### **Absorptive hyphae**

Thin highly branched hyphae which are thought to absorb nutrients.

#### **Spores**

Large (for a fungus) asexual spherical structures (20-1000+  $\mu\text{m}$  diameter) formed on hyphae in soil, or in roots.

### **B. Structures in Roots**

#### **Hyphae**

these are non-septate when young and ramify within the cortex.

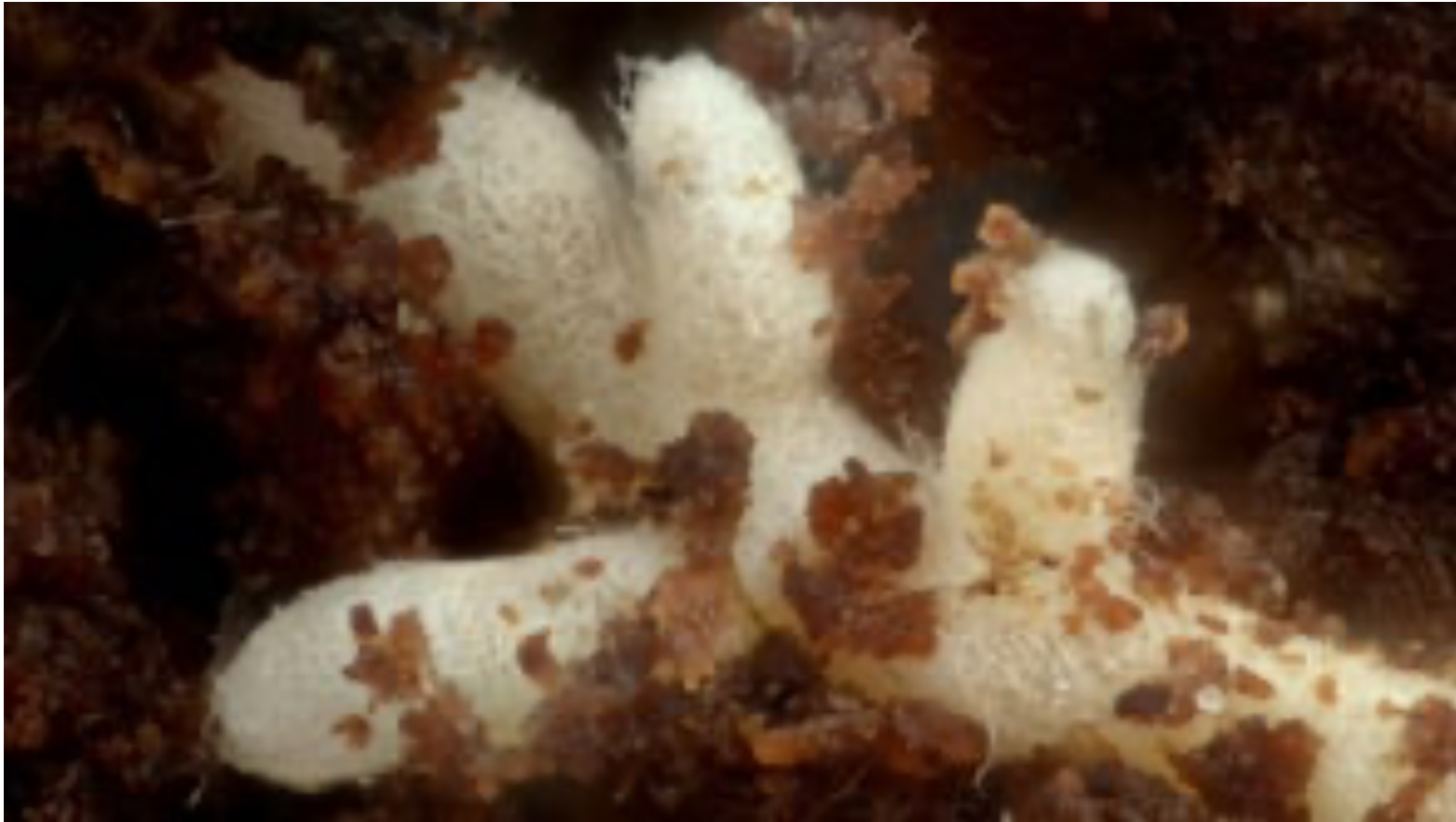
#### **Arbuscules**

intricately branched haustoria in cortex cells.

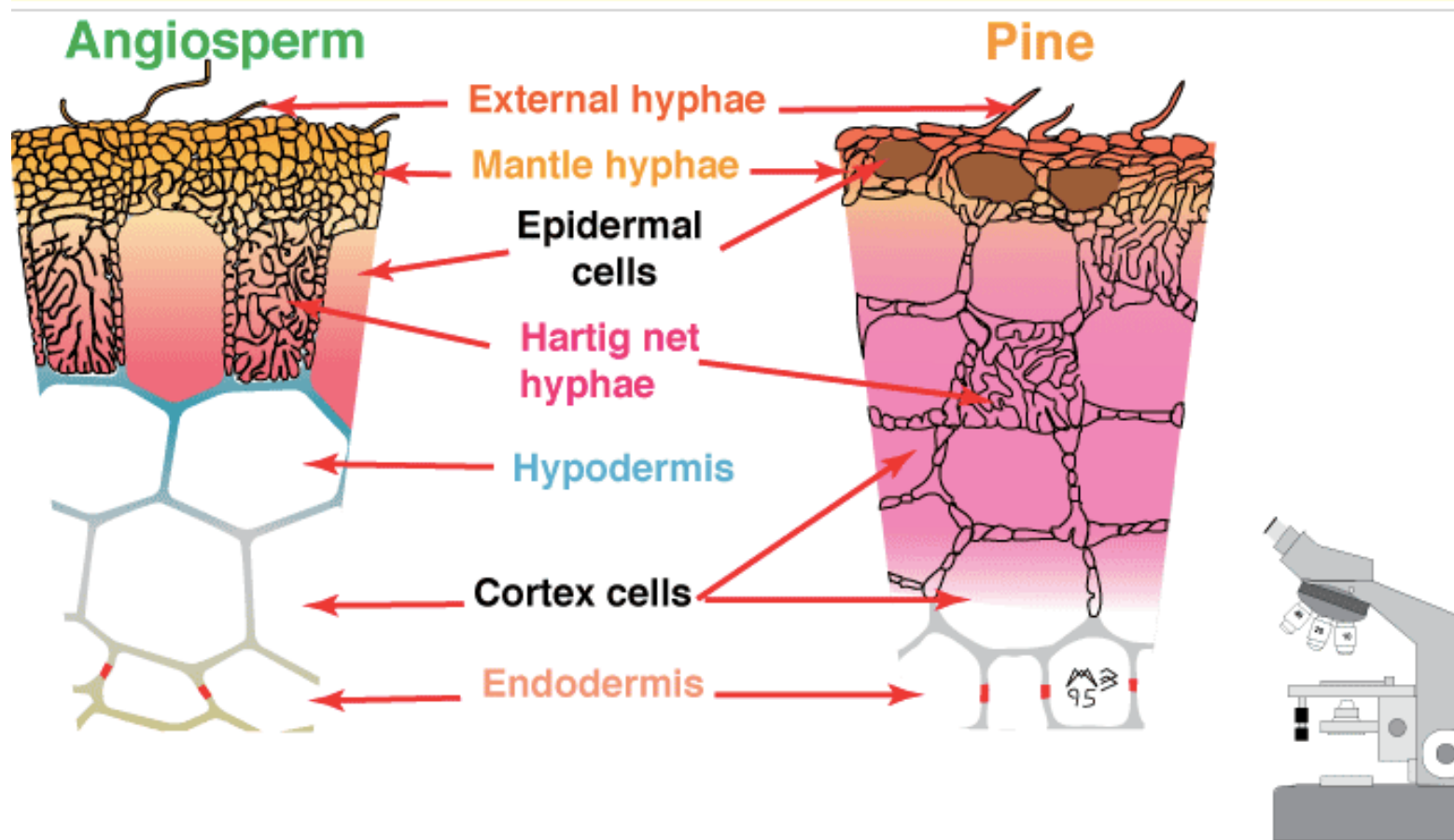
#### **Vesicles**

storage structures formed by many fungi.

# Formação de ECM



<https://vimeo.com/521867504>



<https://mycorrhizas.info/ecm.html>

# Principais diferenças entre AM e ECM

Característica	Micorrizas Arbusculares (AM)	Ectomicorrizas (ECM)
% de sp de plantas que colonizam	~ <b>80%</b> de todas as sp terrestres	~ <b>2%</b> de todas as sp terrestres
Tipos de plantas hospedeiras	Maioria das espécies herbáceas, briófitas; culturas agrícolas (ex: trigo, milho, leguminosas)	Árvores e arbustos lenhosos de florestas temperadas e boreais (ex: pinheiros, carvalhos, eucaliptos)
Riqueza de espécies de fungos	Baixa (~300 espécies descritas)	Altíssima (>5.000 a 10.000 espécies)
Fila envolvidos	Apenas Glomeromycotina (antigo Glomeromycota)	Principalmente Basidiomycota e Ascomycota
Exemplos de géneros	<i>Glomus</i> , <i>Acaulospora</i> , <i>Gigaspora</i>	<i>Amanita</i> , <i>Boletus</i> , <i>Russula</i> , <i>Lactarius</i>

Os 18-20% restantes das espécies de plantas terrestres dividem-se entre plantas que não formam micorrizas (Brassicaceae, Amaranthaceae, Cyperaceae e Juncaceae, e plantas carnívoras) e outros tipos de micorrizas como as ericóides e orquidóides.

# Principais diferenças entre AM e ECM

Característica	Micorrizas Arbusculares (AM)	Ectomicorrizas (ECM)
Tipo de colonização	“Intracelular” no córtex radicular	Intercelular, sem penetrar as células
Estruturas características	Arbúsculos, vesículas, hifas intra- e extrarradiculares	Manto fúngico, rede de Hartig, hifas extrarradiculares
Interface principal de troca	Arbúsculos	Rede de Hartig
Órgãos vegetais colonizados	Raízes jovens e finas	Raízes laterais curtas
Estruturas de propagação	Esporos no solo	Esporos em corpos frutíferos (cogumelos) e micélio
Dependência do hospedeiro	Biotróficos obrigatórios	Muitos simbiontes são também biotróficos, mas com maior diversidade funcional

Tanto AM como ECM aumentam a aquisição de nutrientes e a tolerância ao stress, mas diferem profundamente na estrutura anatômica, nos grupos fúngicos envolvidos e no contexto ecológico em que predominam.

Como estudar fungos que estabelecem AM e ECM?



# 1. Métodos moleculares

Tanto para AM como para ECM, é comum recorrer a técnicas baseadas em DNA:

extração de DNA de raízes ou solo

PCR e qPCR

sequenciação de amplicões (ITS para fungos em geral; 18S rRNA é muito usado para AMF)

metabarcoding e análise de comunidades

Estes métodos permitem:

- identificar taxa não distinguíveis morfológicamente
- comparar diversidade e composição das comunidades
- quantificar grupos específicos

## 2. Métodos funcionais

Para avaliar o impacto ecológico das micorrizas, podem ser medidos:

- biomassa vegetal
- concentração de fósforo e azoto nos tecidos
- atividade enzimática do solo
- agregação do solo
- produtividade primária
- Etc.

# 3. Experiências controladas

Em vasos, câmaras de crescimento, ou no campo, pode-se comparar:

- plantas inoculadas vs não inoculadas
- diferentes espécies fúngicas
- gradientes de fósforo, água ou temperatura
- Etc.

# Efeito da inoculação com AMF na biomassa vegetal

Planta hospedeira: *Zea mays*

Tratamentos:

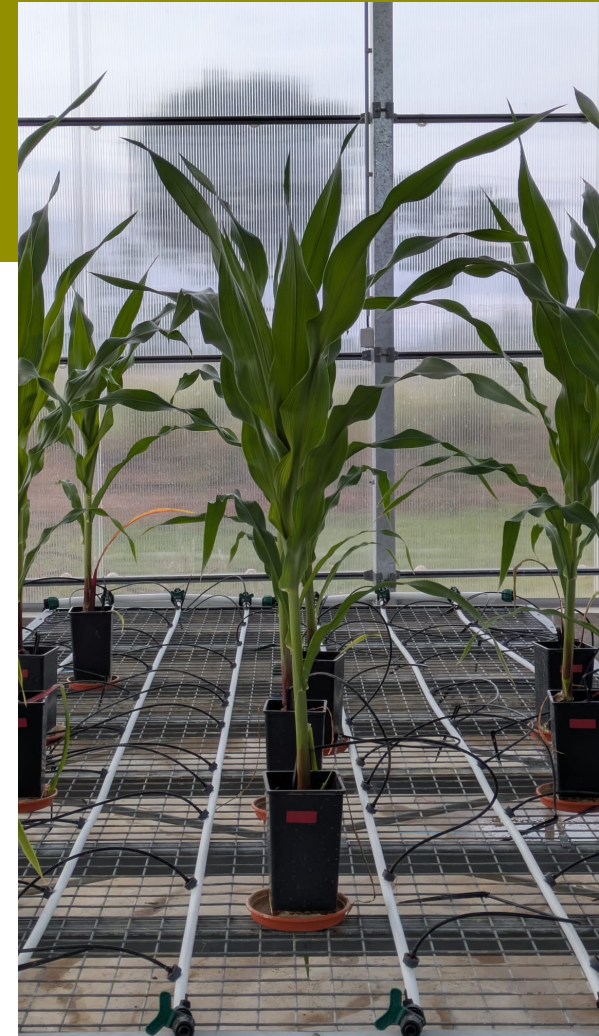
Inoculadas com AMF Mycoshell + inóculo nativo

Não inoculadas (só o inóculo nativo)

\* Plantas foram crescidas durante 8 semanas em vaso, com mistura de substrato comercial e solo (não esterilizado)

Quantificar a biomassa das plantas inoculadas e não inoculadas

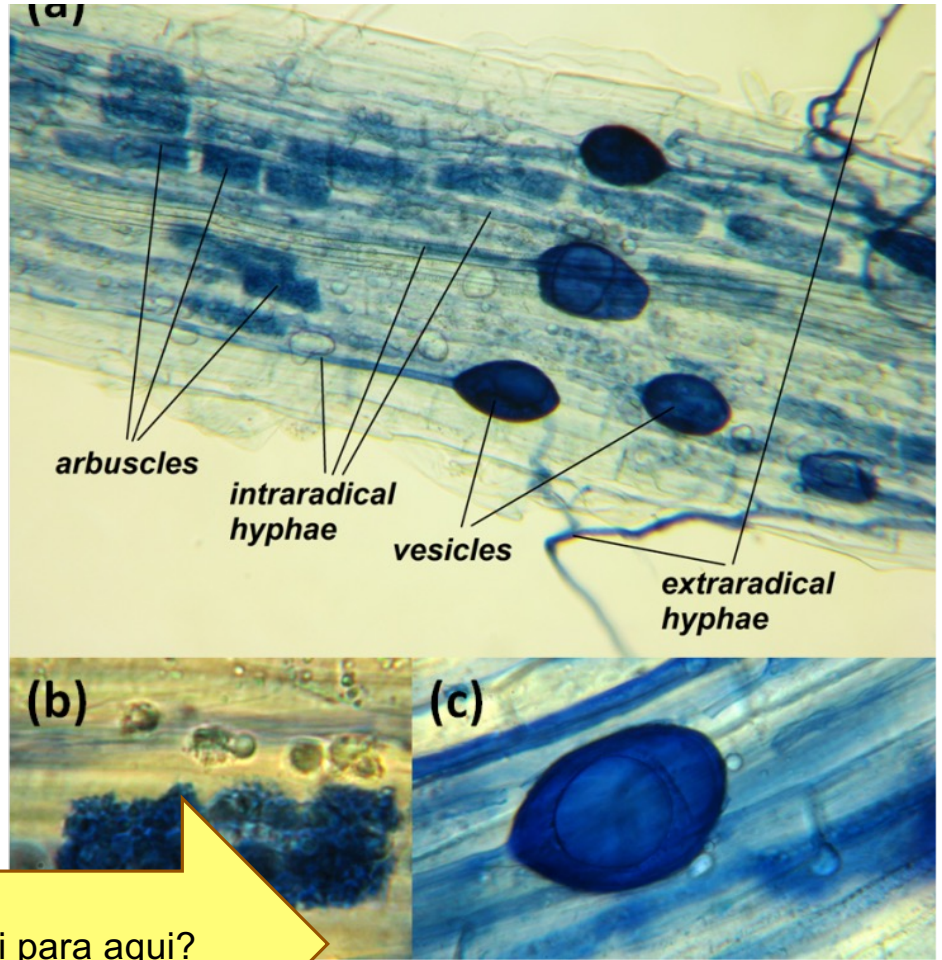
Vantagens e desvantagens de utilizar solo/substrato não estéril



# 4. Avaliação morfológica da colonização - AM

## Colonização radicular

- As raízes são clarificadas e coradas, e observadas ao microscópio para identificar:
  - hifas intrarradiculares
  - arbúsculos
  - vesículas
- A colonização pode ser quantificada por métodos como:
  - interseções em grelha (*gridline intersect method*)
  - escalas semi-quantitativas (ex.: método de Trouvelot)



Como passamos daqui para aqui?

# Lavagem das raízes

Para os passos seguintes, as raízes têm que estar livres de partículas de solo!

1. Lavar bem com água corrente, utilizando um crivo de 2 mm para recuperar pequenos fragmentos de raízes.
2. Recolher segmentos apicais das raízes mais jovens (1-2 cm de comprimento)
3. Se for necessário guardar as raízes, utilizar etanol a 50%.



# “Clearing” das raízes

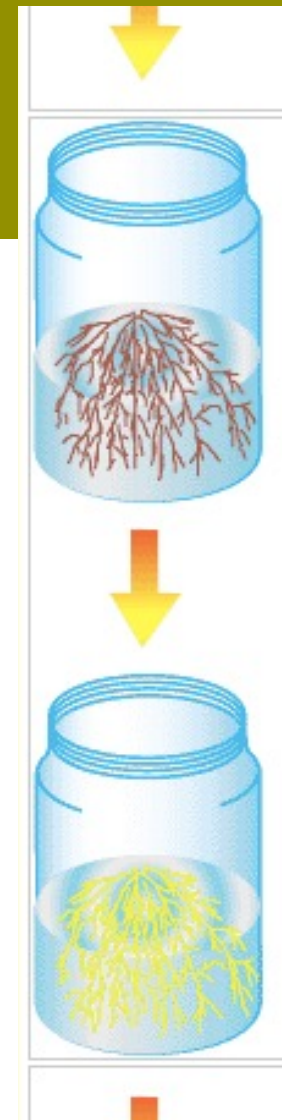
Normalmente utiliza-se KOH a 10% (p/v) para clarificar as raízes. Os procedimentos de clarificação devem ser realizados com amostras de raízes que não excedam 1–2 g.

**Raízes insuficientemente clarificadas** mantêm conteúdos celulares que dificultam a visualização das estruturas micorrízicas, enquanto raízes excessivamente clarificadas podem desintegrar-se.

As raízes podem ser clarificadas em banho-maria, aquecendo a solução de KOH a 60-90 °C.

O tempo necessário varia consideravelmente: **raízes de plantas jovens** geralmente requerem apenas 10-20 minutos, enquanto amostras provenientes do **campo ou raízes fortemente pigmentadas** podem necessitar de períodos muito mais longos, variando entre 5 horas e vários dias. Uma hora de clarificação a 60 °C é aproximadamente equivalente a 5 minutos em autoclave a 121 °C.

Após a clarificação, as raízes são recolhidas num crivo de malha fina e **lavadas várias vezes com água ou com uma solução ácida diluída**, antes de serem transferidas para a solução de coloração.



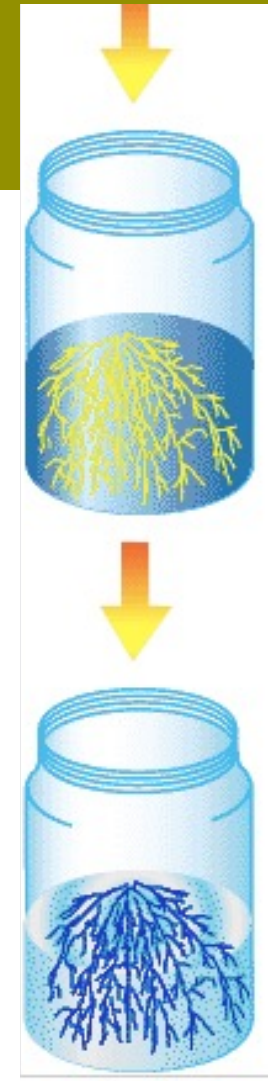
# “Staining” ou coloração

Para observações microscópicas detalhadas, as raízes clarificadas podem ser coradas com **azul de tripano** (Bevege, 1968; Phillips & Hayman, 1970; Kormanik & McGraw, 1982 – liga-se às moléculas de quitina e glucanos) **0,05% (p/v)** em lactoglicerol. A coloração com azul de tripano é adequada para a avaliação dos níveis de colonização, em que o contraste de cor é vantajoso.

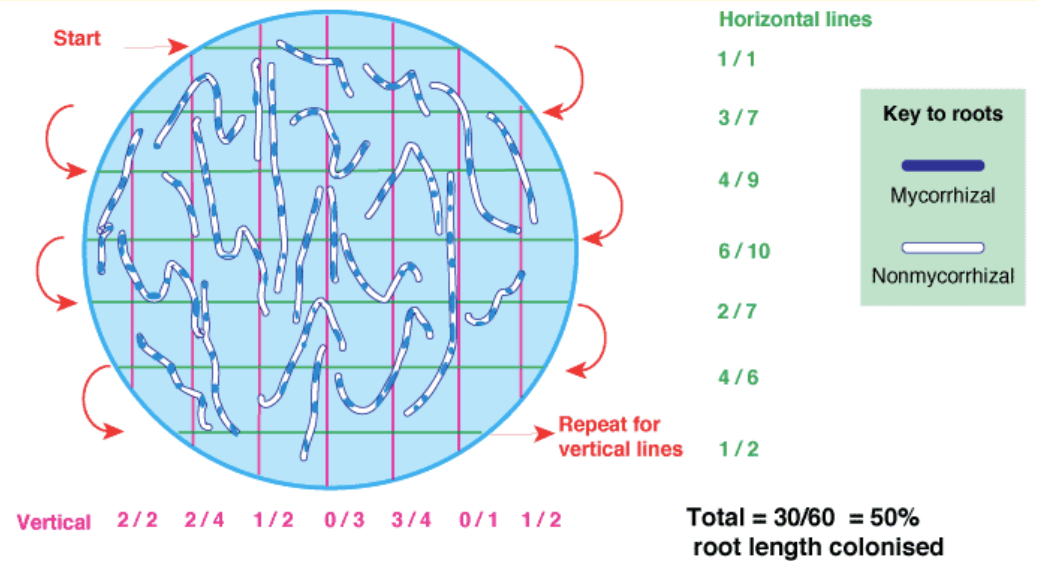
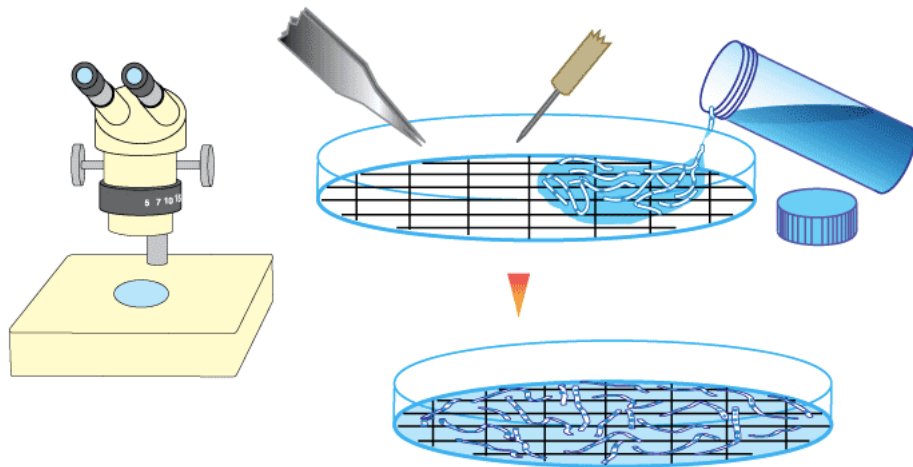
As raízes são coradas aquecendo-as durante **90 min a 60 °C** (ou durante 15 minutos em autoclave a 121 °C, ou deixando-as na solução de coloração à temperatura ambiente durante um ou mais dias).

A solução de coloração pode ser reutilizada várias vezes, desde que seja filtrada após cada utilização através de gaze dobrada ou de uma malha fina de nylon, para remover fragmentos de raízes, até que a solução se torne translúcida.

- Outros corantes: **Chlorazol black E** (CBE) em solução de lactoglicerol a 0,03% (para avaliações microscópicas detalhadas), **fucsina ácida** e **azul de algodão** (tendem a descolorar rapidamente e produzem imagens com baixo contraste; **tinta e vinagre** (tintas pretas ou azuis de escrita).



# Quantificar a colonização: Intersecções em grelha



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)									

## 4. Avaliação morfológica da colonização - AMF

### **Esporos no solo**




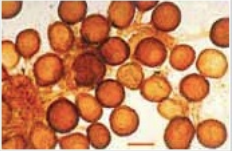



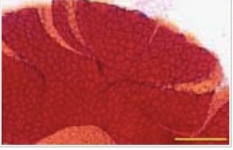
- Os esporos são extraídos por peneiração húmida e centrifugação, e podem ser avaliados quanto a:
  - abundância (esporos/g de solo)
  - morfotipos
  - viabilidade (por exemplo com Iodonitrotetrazolium chloride; INT)

# O que são esporos de AMF?

Os esporos formam-se como dilatações em uma ou mais hifas subtendentes, no solo ou no interior das raízes. Estas estruturas contêm lípidos, citoplasma e **numerosos núcleos** (Sanders, 1999). Os esporos desenvolvem geralmente **paredes espessas** constituídas por mais do que uma camada e podem atuar como propágulos.

Os esporos formam-se quando os nutrientes são remobilizados a partir de raízes em que a associação micorrízica está em senescência. Estas estruturas desempenham funções de **reserva, de resistência** (estádios de dormência) e de **propagação**.

Durante a germinação, os esporos podem formar estruturas germinativas especializadas, ou as hifas podem emergir através da hifa subtendente ou crescer diretamente através da parede do esporo.

	Relatively small white spores of a <i>Glomus</i> species.		Spore of <i>Glomus clarum</i> which has a visible inner wall layer (arrow).
	Sporocarp of <i>Glomus invermaium</i> typical of the dead spores often found in field-collected soil.		Living spores of <i>Glomus invermaium</i> from a pot culture.
<b>Spores of Acaulospora</b>			
	<i>Acaulospora</i> spore with deep pits in the outer wall and inner wall layers stained by Melzer's reagent.		<i>Acaulospora</i> spore with several inner wall layers (arrows). One layer has stained darkly with Melzer's reagent.
<b>Spores of Scutellospora Species</b>			
	White <i>Scutellospora cerradensis</i> spores with prominent brown <u>germination shields</u> .		Large black spore with deep pits of <i>Scutellospora reticulata</i> .

<https://mycorrhizas.info/vam.html#S7>

# Extração dos esporos

Os esporos de AMF presentes nas amostras de solo foram extraídos seguindo o método de Gerdemann e Nicolson (1963).

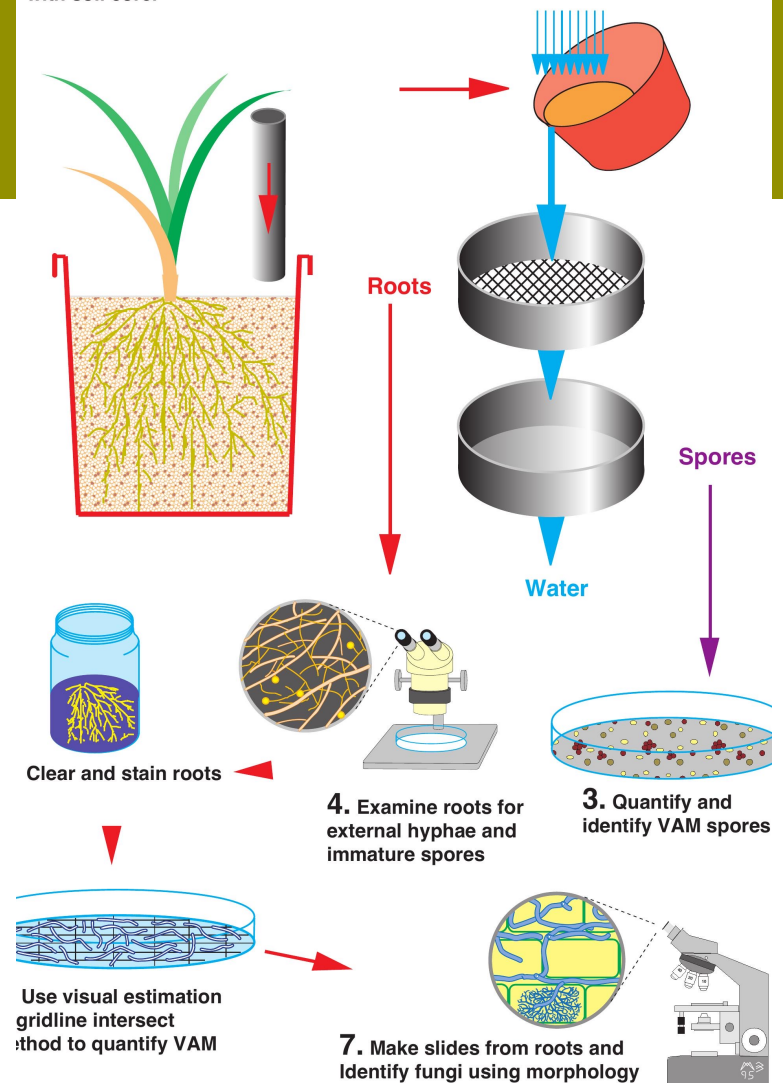
Amostras de **100 g de solo** são suspensas em **1 L de água da torneira**. Após **1 minuto de agitação** e **30 segundos de sedimentação**, o sobrenadante é passado através de um conjunto de três crivos sobrepostos, com malhas de **1000, 100 e 32  $\mu\text{m}$** . O filtrado de cada suspensão de solo é recolhido e peneirado novamente.

Os esporos retidos nos crivos são recuperados para tubos falcon de **50 mL**. Em seguida, é criado um gradiente de viscosidade adicionando **25 mL de uma solução aquosa de sacarose a 60% (p/v)** a cada tubo.

Após centrifugação a **3000 rpm durante 2 minutos**, o sobrenadante é novamente peneirado através de um crivo de **32  $\mu\text{m}$**  e a fração retida, correspondente aos esporos, é lavada com água destilada para remover a sacarose.

1. Sample pot culture with soil corer

2. Wash roots and spores from soil



# Viabilidade dos esporos

Adicionar 1 mL da solução de coloração de INT [2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazólio cloreto 2 mg mL<sup>-1</sup>] a 1 mL da suspensão de esporos de AMF contendo aproximadamente 100 esporos.

**Incubar a mistura a 28 °C durante 72 horas no escuro.**

Observar e contar os esporos de AMF à lupa, com uma grelha de 1 cm, e classificar como:

- i) viáveis, quando apresentavam cor vermelha;
- ii) pouco viáveis, quando eram cor-de-rosa; e
- iii) não viáveis, quando não eram vermelhos nem cor-de-rosa.

Característica	Nº de esporos
Esporos viáveis	
Esporos pouco viáveis	
Esporos não viáveis	
Viabilidade (%)	
Abundância	

Para que serve esta informação?

# Inocular quantos esporos de AMF???

- Vamos usar como inóculo de AMF, o produto comercializado pela empresa Canadiana Premier Tech - *Rhizophagus irregularis* (**4000 esporos mL<sup>-1</sup>**)
  - Assumindo que a **viabilidade dos esporos é de 40%**, quantos esporos vou adicionar
- a) Se pensarmos numa experiência de vaso em que vamos adicionar inóculo de AMF contendo ~250 esporos planta<sup>-1</sup> (Dias et al 2018)



- b) Se pensarmos num ensaio de campo em que vamos adicionar inóculo de AMF  $2,5 \times 10^6$  esporos de AMF ha<sup>-1</sup> (Pacheco et al. 2021)



# 4. Avaliação morfológica da colonização - ECM

## **Morfotipagem de raízes**

- As pontas radiculares são observadas sob lupa ou microscópio para caracterizar:
  - presença de manto fúngico
  - cor e textura
  - ramificação
  - emissão de hifas ou rizomorfos

## **Anatomia**

- Cortes finos podem ser observados ao microscópio para confirmar a presença da:
  - rede de Hartig
  - manto fúngico

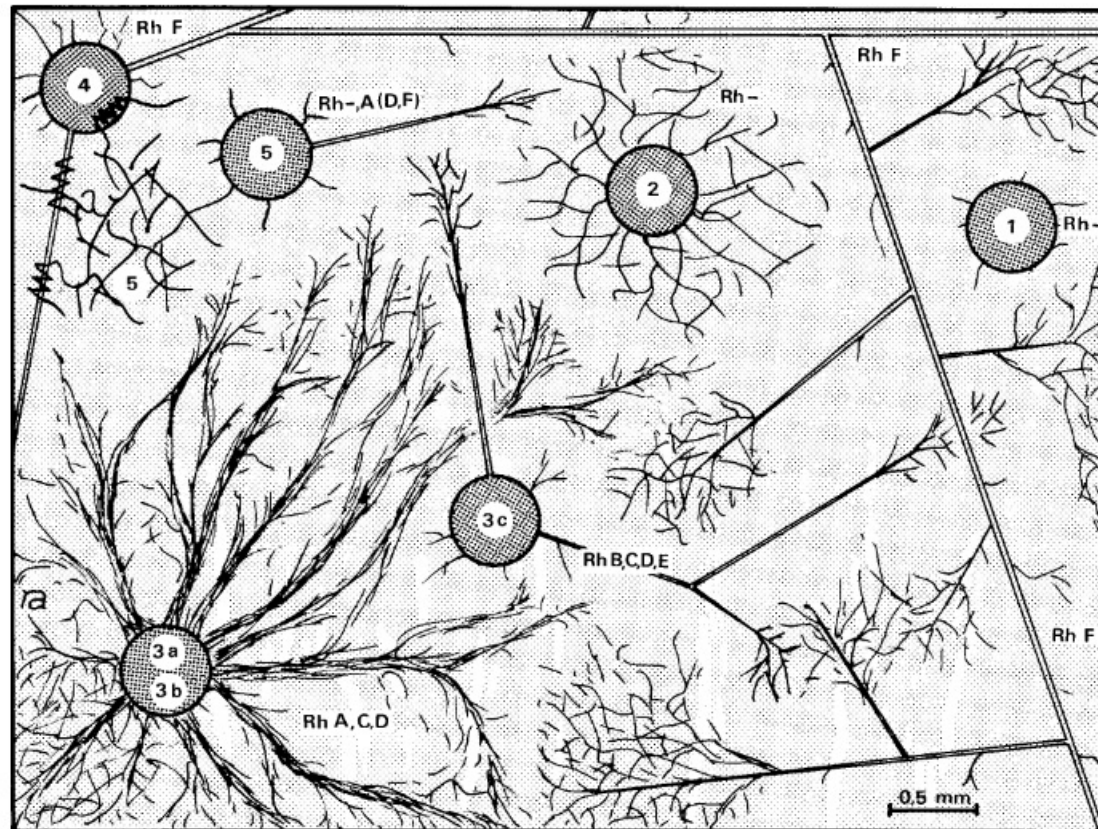
## **Corpos frutíferos**

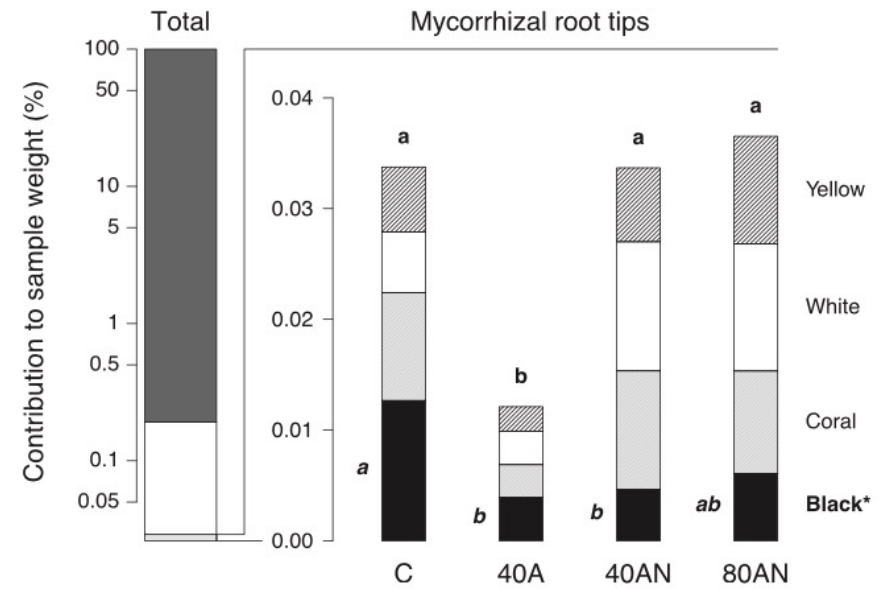
- Cogumelos produzidos por fungos ECM podem ser identificados e relacionados com as raízes colonizadas.

## Exploration types of ectomycorrhizae

A proposal to classify ectomycorrhizal mycelial system of differentiation and putative ecological importance

**Fig. 1** Schematic drawings of different exploration strategies, represented by cross-sections of ectomycorrhizae and the extramatrical mycelium. 1 Contact exploration, 2 short-distance exploration, 3a, b medium-distance fringe exploration and medium-distance mat exploration, 3c medium-distance smooth exploration, 4 long-distance exploration, 5 pick-a-back exploration, shown as mycorrhiza and as soil hyphae in contact and intruding into rhizomorphs and ectomycorrhizae of a long-distance exploration type ectomycorrhiza. All figures are to scale (*Rh* rhizomorph, – rhizomorph lacking, A–F organization types of rhizomorphs according to Agerer 1987–1998, 1991a)





**Fig. 1.** Total contribution of soil (dark grey), roots (white) and mycorrhizal root tips (light grey) on a log scale to overall sample weight (left) and changes in mycorrhizal root tip composition per treatment (right). Letters above the bars indicate significant differences between treatments for all mycorrhizal root tip combined (Pairwise Welch's *t*-test,  $n = 4$ ,  $p < 0.05$ , Bonferroni - Holm correction). The black morphotype also decreases in the treatments (Pairwise Welch's *t*-test,  $n = 3$ ,  $p < 0.05$ , Bonferroni - Holm correction).

# Quantificar a colonização ECM

As raízes colonizadas com fungos ectomicorrízicos (ECM) **não coradas** podem geralmente ser distinguidas de raízes não micorrízicas através de diferenças na cor, espessura, textura e padrões de ramificação.

No entanto, **é necessário um procedimento de clarificação e coloração (como nas AM)** ou de corte histológico para **visualizar a rede de Hartig** e confirmar a presença de uma associação ectomicorrízica.

**Uma etapa de branqueamento após a clarificação**, destinada a remover o excesso de taninos, ajuda frequentemente a evidenciar a rede de Hartig nas raízes ECM.

Depois do *clearing* descrito para as AMF (normalmente com KOH):

1. As raízes são colocadas em solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
  1. frequentemente **10–30% (v/v)**, dependendo do protocolo e da espécie vegetal
2. Incubação:
  1. à temperatura ambiente ou ligeiramente elevada (20–40 °C)
  2. duração: de minutos a algumas horas (ou até overnight em concentrações mais baixas)
3. Lavagem abundante com água destilada
4. Segue-se a coloração (ex: azul de tripano, tinta da China, etc.)

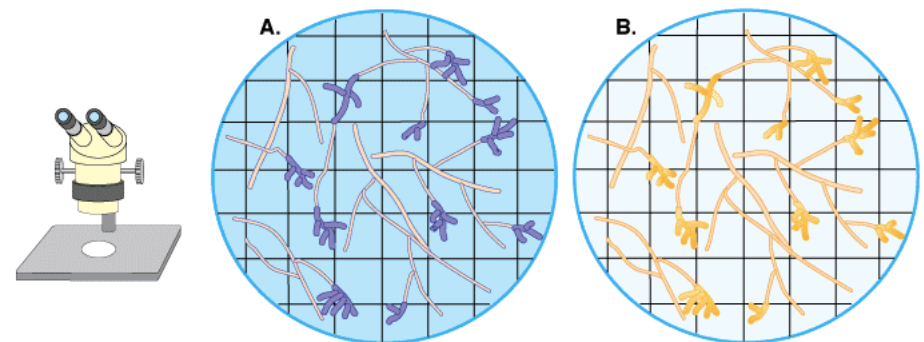
# Quantificar a colonização ECM

Cada ápice radicular micorrízico contém uma **zona ativa da rede de Hartig**. Estes ápices podem ser contados para **quantificar a intensidade da associação**, devendo os seus números ser expressos em relação ao comprimento da raiz e ao volume de solo.

O comprimento radicular de uma amostra pode ser medido pelo **método de interseção em grelha** (gridline intersect method), podendo-se simultaneamente medir o comprimento de raízes micorrízicas ou contar separadamente o número total de ápices micorrízicos.

A associação ectomicorrízica pode ser difícil de reconhecer em raízes não coradas quando existem alterações mínimas na ramificação e espessura da raiz hospedeira.

1. Measure root length of stained (A) or unstained (B) roots with a dissecting microscope using the gridline intersect method



2. Count the length of mycorrhizal roots or the number of mycorrhizal root tips



**Results:** 65 = Root length (cm)  
24 = Mycorrhizal root length (cm)  
36 = Mycorrhizal root tips

<https://mycorrhizas.info/method.html#em1>

# Objectivo geral da aula:

**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 AM)
- 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

# O que vamos fazer na aula?

1. Avaliar a biomassa das plantas inoculadas e não inoculadas com AMF (lab do 5º piso)
2. Observar os principais passos envolvidos no (i) Isolamento de esporos de AMF do solo e (ii) clearing e coloração de AM (lab do 5º piso)
3. Observar esporos de AMF e as principais estruturas de AM ao microscópio (preparações definitivas ao microscópio)
4. Quantificar a colonização por AMF (lupa)
5. Quantificar a abundância de esporos de AMF (lupa)
6. Calcular a viabilidade de esporos de AMF (lupa)
7. Quantificar a colonização por ECM (lupa)
8. Fazer os cálculos