

CRESCIMENTO MICELIAL DE ESPOROS PRÉ-GERMINADOS DO FUNGO ENDOMICORRÍZICO *GIGASPORA GIGANTEA* EM MEIO LÍQUIDO SUPLEMENTADO COM COMPOSTOS ORGÂNICOS NITROGENADOS¹

MARIA HELENA DE FREITAS³ e JOSÉ OSWALDO SIQUEIRA³

RESUMO - Foram avaliados os efeitos de 14 compostos orgânicos nitrogenados sobre o crescimento micelial de esporos do fungo endomicorrízico *Gigaspora gigantea* (Nicol & Gerd) Gerdemann & Trappe. Esporos pré-germinados em ágar-água foram transferidos para tubos com meio nutritivo líquido contendo os aminoácidos glicina, histidina, leucina, lisina, fenilalanina, asparagina, arginina, cistina, cisteína, metionina, prolina, ácido aspártico, ácido glutâmico, e a peptona, os quais foram adicionados individualmente ao meio em diferentes concentrações. Os tubos foram incubados por 15 dias, quando o crescimento micelial foi avaliado através do uso de microscópio estereoscópico. Os aminoácidos histidina, cistina e leucina e a peptona estimularam o crescimento micelial, enquanto a fenilalanina e a metionina mostraram-se inibitórios para o crescimento. A histidina mostrou efeito linear enquanto para leucina e cistina as respostas foram máximas nas concentrações mais baixas dos aminoácidos, seguindo um modelo raiz quadrada. Os demais compostos avaliados não mostraram efeitos significativos sobre o crescimento micelial.

Termos para indexação: micorrizas, fungos micorrízicos, microrganismos do solo, simbiontes biotróficos, nutrição de fungos.

MYCELIAL GROWTH OF PRE-GERMINATED SPORES OF THE ENDOMYCORRHIZAL FUNGUS *GIGASPORA GIGANTEA* IN LIQUID MEDIUM SUPPLEMENTED WITH NITROGENOUS ORGANIC COMPOUNDS

ABSTRACT - The effects of 14 nitrogenous compounds on mycelial growth of *G. gigantea* spores were evaluated in a liquid medium. Spores were pre-germinated in water-agar and transferred to glass tubes with nutrient liquid medium containing one of the following compounds: glycine, histidine, leucine, lysine, phenylalanine, asparagine, arginine, cysteine, methionine, cystine, proline, aspartic acid, glutamic acid and peptone. Each compound was added individually to the nutrient basic medium at three different concentrations. Tubes with spores were incubated at 25-28°C for 15 days when mycelial growth was evaluated by grid intersection method. The amino acids histidine, cysteine and leucine and peptone stimulated fungal growth, while phenylalanine and methionine showed significant growth inhibition. Growth enhancements were linear for histidine, and square-root model for leucine, cystine and peptone. Methionine showed linear inhibition, while phenylalanine exhibited quadratic response. All the other compounds tested showed no significant effect on mycelial growth.

Index terms: mycorrhizae, VA-endomycorrhizae, mycorrhizal fungi, soil microorganisms, biotrophic symbionts, fungal nutrition.

¹ Aceito para publicação em 23 de dezembro de 1993.

Extraído da Dissertação de Mestrado da autora. Trabalho financiado pelo PADCT/FINEP.

² Bióloga, M.Sc., Escola Superior de Agricultura de Mossoró, Caixa Postal 137, CEP 59625-900 Mossoró, RN. Bolsista da CAPES.

³ Eng. - Agr., Ph.D., Prof., Dep. de Ciência do Solo da Esc. Sup. de Agric. de Lavras-ESAL, Caixa Postal 37, CEP 37200-000 Lavras, MG. Bolsista do CNPq.

INTRODUÇÃO

Fungos pertencentes à ordem Glomales dos zigomicetos interagem com as raízes da maioria das plantas, formando associações simbióticas mutualistas denominadas micorrizas vesículo-arbusculares (MVA). Esporos destes fungos possuem os requerimentos metabólicos e a informação genética

para germinação e crescimento inicial do tubo germinativo, mas não são capazes de apresentar crescimento micelial sustentado, diferenciação morfológica e esporulação na ausência de raízes (Siqueira et al., 1985). O caráter de simbiote obrigatório, além de dificultar estudos básicos sobre nutrição, fisiologia e bioquímica, dificulta o cultivo exênico e limita a multiplicação em larga escala e a exploração comercial destes fungos (Siqueira, 1987).

Os conhecimentos sobre o requerimento nutricional dos fungos MVA *in vitro* são escassos, fragmentados, e, na maioria, com resultados inconsistentes, principalmente no que se refere aos requerimentos de fontes de N. Dois estudos independentes conduzidos por Siqueira et al. (1982) e Hepper & Jackobsen (1983) indicaram efeitos benéficos de peptona e certos aminoácidos incorporados a meios de cultivo sólido no crescimento micelial, enquanto estudos bioquímicos demonstram a capacidade de absorção e assimilação para a síntese protéica do aminoácido leucina por esporos de *Glomus caledonius* (Beilby & Kidby, 1982; Beilby, 1983).

No presente trabalho são relatados os efeitos de diversos aminoácidos e de peptona no crescimento micelial de esporos pré-germinados do fungo MVA *Gigaspora gigantea* em meio nutritivo líquido.

MATERIAL E MÉTODOS

Esporos de *Gigaspora gigantea* (Nicol & Gerd) Gerdemann & Trappe foram obtidos em cultivo de vasos de *Brachiaria decumbens* (Stapt) Prain, tendo como substrato Latossolo Roxo, fúmgado com Bromex (260 cc/m³ de solo). Os esporos foram extraídos do solo por peneiramento úmido (Gerdemann & Nicolson, 1963), seguido de centrifugação em água a 3.000 rpm durante três minutos, e em sacarose 45% a 2.000 rpm por dois minutos. Lotes homogêneos de esporos foram desinfestados com hipoclorito de sódio 1% (v/v, 5% de cloro livre), por vinte minutos, e com estreptomicina 100 µg/ml por trinta minutos, conforme descrito em Colozzi Filho (1988). Para germinação, os esporos foram transferidos para placas-de-petri (90 mm), contendo ágar-água 1% (pH 6,4 ± 0,2), colocando-se um esporo no centro de círculos de 1 mm de diâmetro perfurados no meio. As placas foram incubadas em

estufa a 25-28°C, na ausência de luz até a emergência do tubo germinativo. Círculos de ágar contendo esporos livres de contaminantes e com tubo germinativo não superior a duas vezes o seu diâmetro, foram transferidos assepticamente para tubos de ensaio de 1,8 x 14 mm contendo 3 ml de meio nutritivo líquido com os diferentes compostos a serem estudados (Tabela 1).

O meio nutritivo utilizado em todos os experimentos foi resultante de modificações do meio de Hepper (1979), constando de: KCl (4,0 mg/l); MgSO₄ · 7H₂O (4,0 mg/l); Ca (H₂PO₄) H₂O (0,9 mg/l); Fe Na EDTA (0,19 mg/l); tiamina HCl (0,4 mg/l); biotina (0,04 mg/l); vitamina B₁₂ (0,04 mg/l); sacarose P.A. (2.000 mg/l); o pH do meio após autoclavagem a 120°C por vinte minutos foi de aproximadamente 6,0. Para os experimentos com aminoácidos contendo enxofre, MgSO₄ · 7H₂O presente no meio nutritivo, foi substituído por MgCl₂ · 6H₂O para evitar possível influência do enxofre inorgânico na resposta do fungo a estes aminoácidos. Soluções estoque de peptona, aminoácidos e vitaminas foram filtradas individualmente em filtro de membrana com porosidade de 0,45 µm e adicionadas após autoclavagem do meio.

Cada composto foi avaliado separadamente em três concentrações previamente selecionadas (Tabela 1), em delineamento estatístico inteiramente ao acaso. Foram utilizadas parcelas experimentais constituídas por dez tubos contendo, cada um, apenas um esporo, e três repetições para cada tratamento, com um total de 30 tubos. Os tubos foram incubados em estufa a 25-28°C, na ausência de luz pelo período de 15 dias.

TABELA 1. Compostos orgânicos nitrogenados e respectivas concentrações incorporadas em meio nutritivo líquido para crescimento micelial de *G. gigantea*.

Compostos estudados	Concentrações (mg/l)		
L - Glicina, Merck	139	278	556
L - Lisina, Merck	206,3	412,5	825
L - Ácido glutâmico, Pro anaysi	27	53,9	107,8
L - Prolina, Merck	17,3	34,5	69
L - Metionina, Merck	4,3	8,6	17,2
L - Ácido aspártico, CAAL	20,8	41,5	83
DL - Fenilalanina, Merck	6,6	13,2	26,4
L - Histidina, Merck	2,8	5,6	11,2
L - Cistina, Riedel de-Haen	1,15	2,3	4,6
L - Cisteína, Merck	1,15	2,3	4,6
L - Arginina, Riedel de-Haen	13,6	27,2	54,4
L - Asparagina, Ecibra	13,6	27,2	54,4
L - Leucina, Merck	14,6	29,2	58,4
Peptona, Merck	250	500	1000

Após o período de crescimento, os esporos foram observados sob microscópio estereoscópico (40x), sendo avaliados os aspectos morfológicos do micélio quanto à presença de células auxiliares, ramificação terminal das hifas e coloração dos esporos avaliados. O crescimento micelial foi quantificado através da contagem do número de interseções de hifas, conforme método adaptado de Hepper & Jackobsen (1983). Para isto, o micélio de dez esporos foi agrupado, transferido para tubos de ensaio de 125 x 15 mm contendo 50 contas de vidro de 1 mm de diâmetro e os tubos submetidos a agitação de Vortex (Biomatic, Porto Alegre-RS) por trinta segundos, a uma velocidade aproximada de 1500 rpm, obtendo-se fragmentos de $0,8 \pm 0,003$ mm de comprimento. Os fragmentos foram filtrados a vácuo em filtro Millipore quadrículado (9 mm² por quadrícula) e contados com auxílio de microscópio estereoscópico (40x) os números de hifas que interceptavam as linhas da quadrícula.

Os dados obtidos foram transformados pela equação $y = \sqrt{t + 0,5}$, sendo t os dados de contagem e submetidos a análises de variância e regressão, utilizando-se o programa AVBRPOL do Centro de Processamento de Dados da ESAL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 14 compostos nitrogenados avaliados como fonte de N para *G. gigantea in vitro*, apenas os aminoácidos histidina, leucina, cistina, metionina e fenilalanina e a peptona mostraram efeitos significativos ($P < 0,05$) sobre o crescimento micelial medido pelo método da interseção de hifas (Fig. 1a-f). Os demais aminoácidos não exerceram efeitos significativos no crescimento, embora em alguns casos tenham-se observado aumentos de até 30% no crescimento micelial. A histidina mostrou efeito linear positivo até a dose de 11,2 mg/l (Fig. 1d), enquanto a metionina teve efeito linear negativo (Figura 1e). A fenilalanina mostrou-se inibitória em todas as concentrações estudadas (Fig. 1c). A leucina, a cistina e a peptona mostraram respostas segundo modelo raiz quadrada (Fig. 1a, 1b, 1f). Ao contrário da leucina e cistina, peptona mostrou-se inibitória na concentração mais elevada, quando comparada com o tratamento controle. As curvas de resposta de leucina e cistina indicam que *G. gigantea* beneficia-se da adição de quantidades bem pequenas

desses aminoácidos ao meio nutritivo. É possível que a fenilalanina e a metionina possam estimular o crescimento micelial quando utilizadas em concentrações menores que 6,6 e 4,0 mg/l, respectivamente.

Os efeitos benéficos da leucina e cistina, já citados por Beilby & Kidby (1982); Beilby (1983); e Hepper & Jackobsen, (1983) mostram a capacidade dos fungos MVA de utilizar esses aminoácidos para o crescimento micelial. A leucina exógena é absorvida e utilizada na síntese de peptídeos que parecem ser essenciais ao crescimento dos fungos MVA (Beilby & Kidby, 1982) e outros fungos filamentosos (Cool & Leal 1972). A *G. gigantea* mostrou menor resposta e menor requerimento externo de cistina quando comparada com *Glomus caledonius*, avaliado por Hepper & Jackobsen (1983) em meio sólido. Isto pode ser resultante de diferenças na capacidade de absorção e assimilação deste aminoácido entre as duas espécies, ou da maior disponibilidade da leucina em meio líquido, conforme utilizado no presente estudo.

Os efeitos estimulantes da histidina contrastam com os resultados de Hepper & Jackobsen (1983) para *G. caledonius*. Esses autores encontraram efeitos inibitórios no crescimento quando a histidina foi incorporada ao meio nutritivo na concentração de 22,4 mg/l. Como a concentração máxima utilizada no presente trabalho foi de 11,2 mg/l, é possível que esta dose esteja próxima da concentração de estímulo máximo. A adição de peptona estimulou o crescimento até concentração de 500 mg/l e inibiu em concentrações mais elevadas, fato também verificado por Siqueira et al. (1982) com *Gigaspora margarita* crescendo em meio nutritivo sólido. O efeito inibitório da peptona parece ser devido à presença de aminoácidos como a fenilalanina e a metionina, capazes de inibir o crescimento micelial. O efeito estimulatório da peptona em concentrações mais baixas pode ser atribuído à sua capacidade de fornecer C, N, S, e vitaminas (Kalisz & Moore, 1986). No entanto, como o meio nutritivo utilizado neste estudo contém esses fatores nutricionais, a peptona parece ser utilizada como fonte de aminoácidos ou N para a *G. gigantea*. Embora estímulos no crescimento micelial tenham sido verificados pela suplementa-

ção do meio com certos compostos nitrogenados, a essencialidade destes para os fungos MVA só poderá ser confirmada após a realização de estudos bioquímicos que evidenciam sua absorção e

incorporação no metabolismo dos esporos ou do micélio.

O fato de que a maioria dos aminoácidos estudados mostraram efeitos depressivos ou nulos em

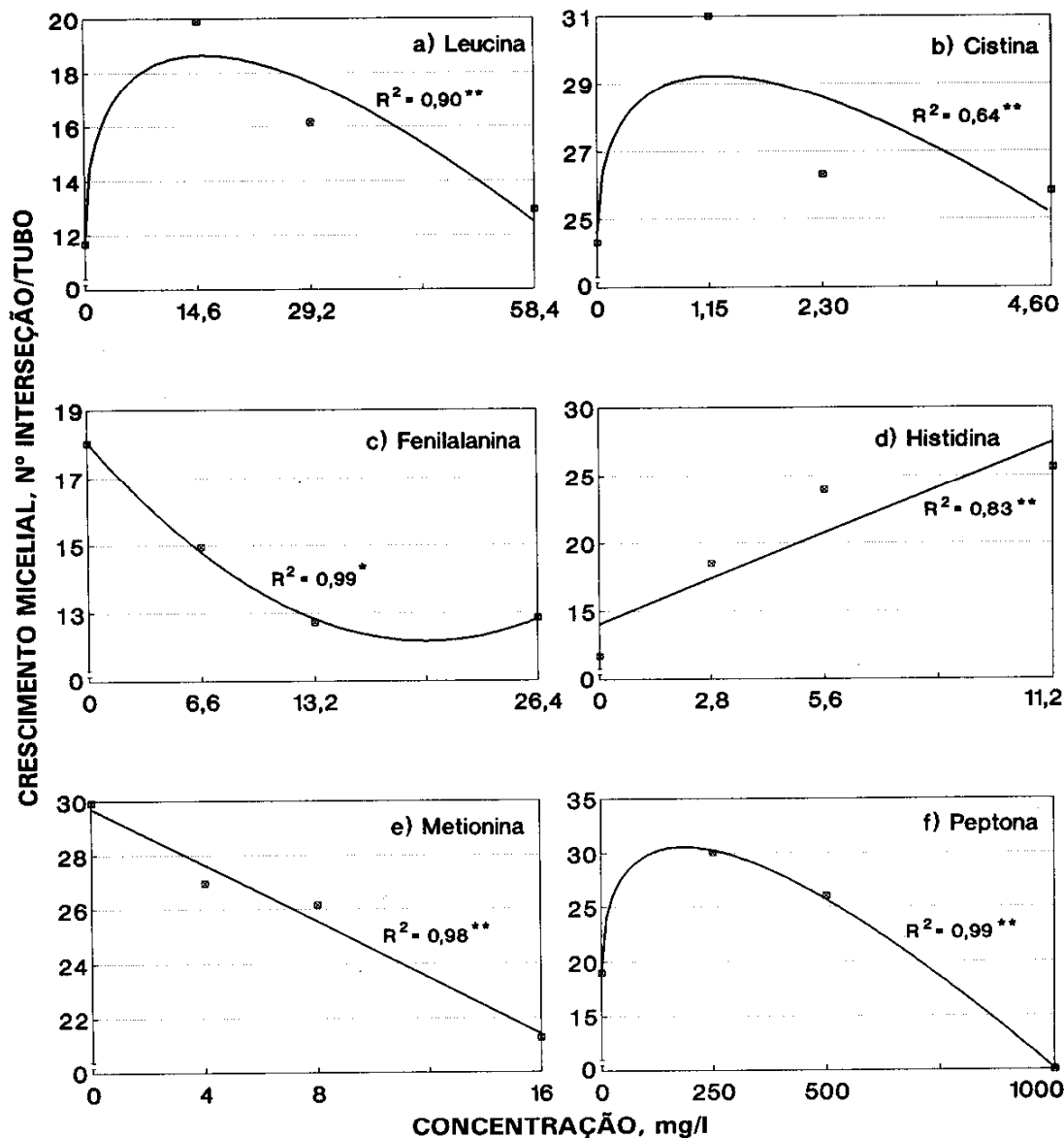


FIG. 1. Resposta em crescimento micelial do fungo *G. gigantea* em meio nutritivo líquido suplementado com compostos nitrogenados em diferentes concentrações. Dados transformados pela equação $\sqrt{t+0,5}$.

relação ao crescimento micelial é, de certo modo, inesperado, pois, existem indicações de que esporos de fungos MVA possuem baixa capacidade de sintetizar aminoácidos como a glicina, a metionina, a cisteína, a lisina, a prolina e a fenilalanina (Beilby & Kidby, 1982; Beilby, 1983). Se esses esporos não são capazes de sintetizar esses aminoácidos, espera-se que eles possam estar entre os fatores limitantes para o crescimento do fungo na ausência de raízes, e assim, deveriam responder positivamente à adição destes ao meio de crescimento, como foi verificado para *G. caledonius* (Hepper & Jackobsen, 1983). A ausência de resposta destes fungos a esses aminoácidos *in vitro* já foi também constatada em outro estudo não publicado conduzido pelo co-autor do presente trabalho, e pode ser devido: a) à inviabilidade das hifas de absorver e assimilar esses compostos; b) à alta reserva interna de aminoácidos no esporo; c) à não-essencialidade dos mesmos para síntese protéica na fase de germinação e crescimento inicial do tubo germinativo.

Tem sido sugerido que a quantidade de aminoácidos exsudados na rizosfera exerce grande influência no crescimento das hifas e colonização das raízes pelos fungos MVA (Ratnayake et al., 1978; Schwab et al., 1983). Como a composição de aminoácidos dos exsudados radiculares é influenciada pela nutrição da planta hospedeira (Schwab et al., 1983), e os fungos MVA reagem de modo diferenciado a esses compostos, pode-se sugerir que a concentração relativa dos aminoácidos na rizosfera desempenharia um papel mais importante no estabelecimento da simbiose MVA do que a quantidade total de aminoácidos exsudada, conforme proposto por Ratnayake et al. (1978). Esse aspecto merece ser avaliado no sistema MVA.

CONCLUSÕES

1. Dos quatorze compostos orgânicos nitrogenados apenas os aminoácidos leucina, histidina, cistina e a peptona estimularam o crescimento micelial de esporos pré-germinados de *G. gigantea* em meio nutritivo líquido.

2. A adição de metionina e fenilalanina, mesmo nas concentrações mais baixas avaliadas, mostra-

ram-se inibitórias para o crescimento micelial da *G. gigantea*.

3. Os compostos glicina, lisina, ácido glutâmico, ácido aspártico, prolina, cisteína, arginina e asparagina não exerceram efeitos significativos sobre o crescimento micelial.

REFERÊNCIAS

- BEILBY, J.P. Effects of inhibitors on early protein, RNA and lipid synthesis in germinating vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores of *Glomus caledonius*. *Canadian Journal of Microbiology*, v.29, p.596-601, 1983.
- BEILBY, J.P.; KIDBY, D.K. The early synthesis of RNA, protein, and some associated metabolic events in germinating vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores of *Glomus caledonius*. *Canadian Journal of Microbiology*, v.28, n.7, p.623-628, 1982.
- COLOZZI FILHO, A. **Desinfestação superficial de esporos de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares**. Lavras: ESAL, 1988. 80p. Tese de Mestrado.
- COOL, J.; LEAL, J.A. Utilization of L-leucina, a nitrogen source by fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, v.59, n.1, p.104-114, 1972.
- GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, v.46, p.235-244, 1963.
- HEPPER, C.M. Germination and growth of *Glomus caledonius* spores: The effects of inhibitors and nutrients. *Soil Biology and Biochemistry*, v.11, n.3, p.269-277, 1979.
- HEPPER, C.M.; JACKOBSEN, I. Hyphal growth from spores for the mycorrhizal fungus *Glomus caledonius*: effect of amino acids. *Soil Biology and Biochemistry*, v.15, n.1, p.55-58, 1983.
- KALISZ, H.M.; MOORE, D. Protein utilization by basidiomycete fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, v.86, p.519-525, 1986.
- RATNAYAKE, M.; LEONARD, R.T.; MENGE, J.A. Root exudation in relation to sysple of phosphorus and its relevance to mycorrhizal formation. *New Phytologist*, v.81, p.543-552, 1978.

- SCHWAB, S.M.; MENGE, J.A.; LEONARD, R.T. Quantitative and qualitative effects of phosphorus on extrats and exudates of sudangrass roots in relation to vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. **Plant Physiology**, v.73, n.3, p.761-765, 1983.
- SIQUEIRA, J.O. Cultura axênica e monoxênica de fungos micorrizicos vesiculo-arbusculares. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 2., 1987, São Paulo. **Anais...** São Paulo: SEMA/SEAG/USP, 1987. p.44-70.
- SIQUEIRA, J.O.; HUBBELL, D.H.; SCHENCK, N.C. Spore germination and germ tube growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in vitro. **Mycologia**, v.74, n.6, p.952-959, 1982.
- SIQUEIRA, J.O.; SYLVIA, D.M.; GIBSON, J.; HUBBELL, D.H. Spores, germination and germ tubes of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, v.31, p.965-972, 1985.