

MARIA HELENA DE FREITAS

EFEITOS DE AMINOÁCIDOS E DE PEPTONA SOBRE O
CRESCIMENTO MICELIAL DE *Gigaspora gigantea* in vitro.

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de [concentração Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do grau de "MESTRE".

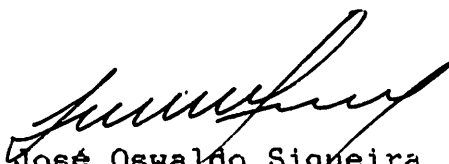
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS

LAVRAS - MINAS GERAIS

1990

EFEITOS DE AMINOACIDOS E DE PEPTONA SOBRE O CRESCIMENTO
MICELIAL DE Gigaspora gigantea *in vitro*.

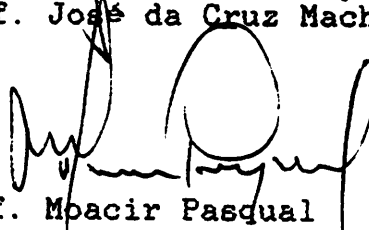
Aprovada:



Prof. José Oswaldo Siqueira
(Orientador)



Prof. José da Cruz Machado



Prof. Moacir Pasqual



Pesq. Elizabeth de Oliveira

Aos meus pais

Geraldo e Maria

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), pela oportunidade concedida.

A Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos, a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e ao Programa de Apoio, Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT) pelo financiamento da pesquisa.

Ao professor José Oswaldo Siqueira, pelas sugestões e orientação na realização do presente trabalho.

A Elizabeth de Oliveira, pela colaboração e sugestões neste trabalho e também pelo estímulo e amizade.

Ao laboratorista Manoel Aparecido da Silva, pela valiosa ajuda na execução dos trabalhos.

Ao professor Rubens Delly Veiga pelo auxílio nas análises estatísticas e amizade.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação, em especial à Lúcia Cangussu, pela amizade e ótima convivência.

As companheiras de república, Alaíde, Lúcia e Tida, pela constante amizade e consideração.

A Augusto Câmara, pelo carinho e incentivo.

Aos meus irmãos Célia, Fátima, Wanda e Carlos, aos meus cunhados Giovane, Sérgio e Ivonil, aos meus sobrinhos Wanderson, Vinícius e Lais, e à amiga Sandra, pela alegria e estímulo.

Aos meus amigos.

BIOGRAFIA DO AUTOR

MARIA HELENA DE FREITAS, filha de Geraldo Moreira de Freitas e Maria Mustafa de Freitas, natural de Moreira Sales, estado do Paraná, nascida aos 30 dias de abril de 1963.

Em agosto de 1982 iniciou o curso de licenciatura em Ciências Biológicas na Universidade Estadual de Maringá, graduando-se em julho de 1985.

Em janeiro de 1986 iniciou o bacharelado em Ciências Biológicas na Universidade Estadual de Londrina, concluindo-o em dezembro de 1986.

Em março de 1987 iniciou o curso de pós-graduação em Agronomia, área de concentração Solos e Nutrição de Plantas, sub-área Microbiologia do Solo, na Escola Superior de Agricultura de Lavras, concluindo-o em 15 de fevereiro de 1990.

INDICE

	Página
LISTA DE QUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Aspectos gerais da nutrição nitrogenada de fungos .	3
2.2. Fungos micorrízicos vesículo-arbusculares (FMVA).	7
2.2.1. Aspectos gerais	7
2.2.2. Crescimento micelial dos FMVA <i>in vitro</i> ...	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Obtenção e preparo dos esporos	18
3.2. Instalação e condução dos ensaios	20
3.3. Avaliação do crescimento micelial	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1. Efeitos da adição de aminoácidos e peptona em meio nutritivo sobre o crescimento micelial de <u>G.</u> <u>gigantea</u>	24
4.2. Aspectos morfológicos do crescimento micelial de <u>G. gigantea</u> na presença de compostos orgânicos nitrogenados	37
4.3. Considerações Finais	41
5. CONCLUSÕES	45
6. RESUMO	46
7. SUMMARY	48
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

LISTA DE QUADROS

Quadros	Página
1 Compostos orgânicos nitrogenados e concentrações incorporadas em meio nutritivo para estudos de crescimento micelial de <u>Gigaspora gigantea</u> <i>in vitro</i>	22
2 Análises de variância para número de interseções de hifas nos experimentos de fontes orgânicas de nitrogênio, considerando concentração como fonte de variação, para o fungo <u>Gigaspora gigantea</u> . Dados transformados $(Y = \sqrt{t + 0,5})$, ESAL, Lavras-MG, 1989.	25
3 Equações de regressão para número de interseções de hifas nos experimentos de fontes orgânicas de nitrogênio para o fungo <u>Gigaspora gigantea</u> . Dados transformados $(Y = \sqrt{t + 0,5})$, ESAL, Lavras-MG, 1989.	31

Quadros	Página	
4	Análise de variância do experimento de combinação de aminoácidos. Dados transformados $(Y = \sqrt{t + 0,5})$, ESAL, Lavras-MG, 1989.	35
5	Características morfológicas de esporos de <u>Gigaspora gigantea</u> em meio nutritivo contendo diferentes compostos orgânicos nitrogenados. ESAL, Lavras - MG, 1989.	40

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Resposta de <u>Gigaspora gigantea</u> à adição de aminoácidos e peptona ao meio nutritivo	26
2	Efeito de compostos orgânicos nitrogenados sobre o crescimento micelial de <u>Gigaspora gigantea</u>	32
3	Efeito dos aminoácidos, His = histidina (11,2 mg/l); Leu = leucina (14,6 mg/l); Cys = cistina (1.15 mg/l) e sua combinação sobre o crescimento micelial de <u>Gigaspora gigantea</u>	35
4	Azigosporo de <u>Gigaspora gigantea</u> germinado em ágar-água (A), retração citoplasmática da hifa (B), crescimento micelial e células auxiliares (C), hifas com citoplasma intermitente septados (D).	38

1. INTRODUÇÃO

O papel dos fungos micorrizicos vesículo-arbusculares (FMVA) na nutrição e crescimento da maioria das espécies vegetais é amplamente conhecido. Por esses efeitos, eles constituem grande potencial para uso na agricultura, principalmente de clima tropical, onde predominam solos minerais deficientes em nutrientes e com elevada acidez.

Contudo, apesar dos estudos acerca destes fungos terem recebido grande ênfase nos últimos anos, pouco ainda se conhece sobre os aspectos nutricionais, fisiológicos e bioquímicos do desenvolvimento dos mesmos, sendo sua multiplicação em cultura pura no laboratório ainda inexistente. Vários meios de cultivo têm sido sendo testados, mas até o momento, nenhum destes mostrou-se capaz de sustentar o crescimento e esporulação desses fungos na ausência de tecido vivo da planta hospedeira. Esta dependência dos fungos a raízes metabolicamente ativas constitui o principal obstáculo para estudos básicos sobre sua biologia e exploração comercial destes em larga escala.

Baseando-se nestes fatos, estudos sobre o requerimento nutricional dos FMVA, de forma a obter subsídios para o seu

desenvolvimento em meio de cultura, na ausência de raízes vivas, tornam-se de grande importância. Se bem sucedidos, possibilitariam sua aplicação mais ampla na agricultura, permitiriam estudos de manipulação genética e seleção de espécies mais adequadas para condições específicas de solo e planta, possibilitando sua exploração. Diante disto o presente trabalho teve por objetivos verificar os efeitos de aminoácidos e de peptona sobre o crescimento micelial de Gigaspora gigantea, visando elucidar a exigência destes fungos a estes compostos nitrogenados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Aspectos gerais da nutrição nitrogenada de fungos*

O estabelecimento de microrganismos em meio de cultura depende do fornecimento dos requerimentos nutricionais essenciais a sua fisiologia e desenvolvimento. Dentre os elementos nutricionais, o nitrogênio é o maior regulador do metabolismo celular e requerido na síntese de uma variedade de importantes constituintes celulares, incluindo aminoácidos e proteínas; purinas, pirimidinas e ácidos nucleicos; glucosamina e quitina e várias vitaminas, sendo portanto indispensável para o crescimento e desenvolvimento dos fungos. Mudanças na forma e quantidade de nitrogênio disponível no meio tem alterado radicalmente o metabolismo celular, embora a maioria dos fungos sejam capazes de utilizar uma ampla variedade de compostos como fonte de nitrogênio. A maior parte dos estudos tem sido feita principalmente com nitrato, nitrito, amônia, aminoácidos e uréia, mostrando que alguns tipos de compostos nitrogenados podem ser utilizados preferencialmente por uma espécie ou isolado em particular (19, 22, 42, 43 e 46). O transporte de moléculas pequenas através da membrana plasmática representa o

primeiro ponto no qual o fungo pode exercer controle na incorporação de fontes de nitrogênio e por esta razão tem sido dada grande ênfase aos mecanismos de absorção. Com exceção de proteínas, a maioria dos compostos nitrogenados são pequenos e capazes de penetrar diretamente na célula, não exigindo mecanismos de transporte especializados. Por outro lado, aminoácidos que constituem um dos maiores e mais diversos grupos de substâncias transportadas através da membrana fúngica, envolvem uma variedade de diferentes sistemas de transporte passíveis de controle pelo processo assimilatório dessas fontes de nitrogênio, GARRAWAY & EVANS (19) e GRIFFIN (22). Contudo, apesar da facilidade na absorção de fontes nitrogenadas simples, a habilidade dos fungos em utilizar formas de nitrogênio inorgânico que não amônia, depende da presença de enzimas ou sistema enzimático capaz de converter estes compostos em amônia e incorporá-la em compostos orgânicos. O conhecimento da via metabólica de assimilação de nitrato e nitrito mostra que sua absorção depende da atividade das enzimas nitrato e nitrito redutase, presentes na parede celular, que permitem a redução dessas formas de nitrogênio à forma amoniacal, GARRAWAY & EVANS (19). A utilização de nitrato é ampla na maioria dos fungos, mas inabilidade em utilizar essa forma de nitrogênio é comum em Blastocladales, Saprolegniaceae, leveduras e basidiomicetos superiores, LANDECKER (39) e NICHOLAS (46), e embora nitrito possa ser utilizado também como fonte de nitrogênio por alguns fungos ele é, muitas vezes, tóxico a

muitas espécies, devido à sua habilidade em deaminar aminoácidos e interferir no metabolismo de enxofre por causa da sua similaridade com o íon sulfito, GARRAWAY & EVANS (19) e LANDECKER (39). De maneira geral o íon amônio é preferencialmente assimilado em comparação com outras formas de nitrogênio inorgânico e parece ser um importante fator no desenvolvimento dos fungos (14, 17 e 58), além de exercer papel fundamental como regulador de vários sistemas metabólicos.

A maior facilidade na assimilação de íon amônio resulta geralmente, em benefícios ao crescimento micelial e confere grande valor ecológico para fungos do solo onde menor gasto de energia é despendido na utilização dessa forma reduzida de nitrogênio. Assume-se que fungos capazes de crescer em meio contendo apenas nitrogênio mineral possuem o sistema enzimático requerido para formar todos os compostos nitrogenados necessários à sua fisiologia e desenvolvimento. No entanto, nem todos os grupos de fungos possuem esta habilidade e uma grande parte requer determinados compostos nitrogenados específicos como peptídeos, proteínas, vitaminas e certos aminoácidos, LILLY (42). Isso ocorre em geral pelo fato desses fungos apresentarem geralmente falhas na capacidade de síntese destes compostos devido à falta de uma ou mais enzimas das vias metabólicas.

A capacidade de fungos em utilizar fontes orgânicas de nitrogênio está, portanto, diretamente relacionada à assimilação e aspectos metabólicos envolvidos nos processos biossintéticos de moléculas complexas, podendo ser utilizados em maior ou

menor extensão dependendo do fungo e composto específico fornecido, GARRAWAY & EVANS (19).

Apesar de vários estudos, muitos processos metabólicos dos fungos são ainda desconhecidos, dificultando o entendimento e elucidação dos mecanismos operantes durante seu desenvolvimento. Normalmente fungos podem utilizar aminoácidos como fonte de nitrogênio e incorporá-los diretamente às proteínas, mas variações consideráveis na taxa de absorção e na extensão pela qual estes podem ser utilizados para o crescimento e esporulação tem sido verificadas para várias espécies fúngicas (19, 21 e 48).

Efeitos específicos de aminoácidos têm sido relatados na literatura para muitos fungos (9, 17, 34, 40, 73 e 74), mostrando que o requerimento em aminoácidos varia com a espécie de fungo utilizada, com o estágio de desenvolvimento e com as condições de cultivo empregadas, GARRAWAY & EVANS (19) e OLUFOLAJI (48), dificultando desta maneira generalizações. Acredita-se que fungos que não mostram requerimento específico por aminoácidos sejam capazes de sintetizar todos os aminoácidos necessários ao seu metabolismo a partir de reações de transaminação de aminoácidos doadores de grupo amina, ou obtêm os aminoácidos através da reciclagem de seus constituintes nitrogenados pelo processo de autólise, GARRAWAY & EVANS (19). Contudo, parece que de maneira geral, benefícios para o crescimento dos fungos tem sido obtidos com asparagina, ácido glutâmico, glicina e ácido aspártico, NICHOLAS (46). Mistura de aminoácidos ou

fontes complexas de nitrogênio como caseína hidrolisada e peptona permitem maior e mais rápido desenvolvimento dos fungos que aminoácidos fornecidos individualmente (9, 30, 39, 47 e 53). A capacidade dos fungos em utilizar proteínas e polipeptídeos de cadeia curta depende da secreção de enzimas exocelulares que hidrolizam estas moléculas em subunidades menores, possíveis de serem assimiladas, GARRAWAY & EVANS (19) e GRIFFIN (22).

Fica evidente, portanto, que vários compostos nitrogenados podem servir de substrato para os fungos, mas a resposta do organismo a um fator em particular depende da estrutura química da molécula a ser transportada e do metabolismo celular do organismo, determinado pela sua composição genética, GARRAWAY & EVANS (19).

2.2. *Fungos micorrízicos vesículo-arbusculares (FMVA)*

2.2.1. Aspectos gerais

Propágulos dos *FMVA* encontram-se amplamente distribuídos no solo e rizosfera da maioria das plantas, ZAMBOLIN & SIQUEIRA (75). Sob condições favoráveis os esporos contidos no solo germinam e o tubo germinativo cresce na rizosfera formando hifas geralmente asseptadas, que entram em contato com raízes susceptíveis da planta hospedeira e penetram as células

epidérmicas, colonizando o sistema radicular inter e intracelularmente, SIQUEIRA (60). Através de modificações do micélio intraradicular o fungo produz estruturas típicas e diferenciadas quanto à forma e função conhecidas como arbúsculos, vesículas e esporos, BRUNETT *et alii* (7). Os arbúsculos são estruturas intracelulares formadas por ramificações dicotômicas das hifas e constituem sítios de trocas metabólicas entre os dois organismos, COX *et alii* (13). As vesículas e esporos são ricos em lipídeos e podem originar-se de hifas extraradiculares ou intraradiculares, funcionando como órgãos de reserva e como propágulos do fungo, garantindo a sobrevivência e dispersão dos mesmos, TRAPPE & SCHENCK (69).

Uma vez estabelecida a associação, as hifas extraradiculares do fungo ramificam-se e absorvem nutrientes da solução do solo. Este micélio extraradicular aumenta a área de absorção das raízes, contribuindo principalmente na absorção de íons de baixa mobilidade como *P*, *Zn*, *Cu* e *Fe*, que são translocados através das hifas até os arbúsculos, onde ocorre a troca por metabólicos fotossintéticos, COX *et alii* (13). Os processos de transferência e seus mecanismos de controle não são bem conhecidos, mas dependem de mecanismos balanceados para o perfeito funcionamento da simbiose, SIQUEIRA (60). Além do aumento na absorção de nutrientes promovido pelo fungo, efeitos das MVA sobre a relação água-planta, agregação de partículas de solo, redução na severidade de algumas doenças radiculares causadas por fungos, bactérias e nematóides, aumento na produção de

fitohormônios, favorecimento da nodulação e fixação biológica de nitrogênio têm sido relatados, conforme revisado por SIQUEIRA (60). Este conjunto de benefícios, permite maior desenvolvimento da planta e melhor adaptabilidade às condições adversas de clima e solo, justificando o grande interesse por estes fungos. Contudo, o seu efeito benéfico é ainda condicionado a fatores inerentes à planta hospedeira, ao meio ambiente e ao próprio fungo, ZAMBOLIM & SIQUEIRA (75), necessitando-se conhecê-los para permitir a exploração desta simbiose em benefício da produção vegetal.

Os *FMVA* estão classificados na subdivisão, Zygomycotina, classe Zygomycetes, ordem Endogonales, família Endogonaceae, gêneros Glomus, Gigaspora, Acaulospora, Entrophospora, Sclerocystis e Scutellospora. A identificação a nível de gêneros e espécies é feita com base na ornamentação e número de grupos de parede dos esporos, cor e dimensão dos mesmos e outras características morfológicas peculiares a cada espécie, SCHENCK & PEREZ (55). Atualmente o número de espécies conhecidas é superior a 100 e frequentemente novas espécies são encontradas e descritas. Dentre as espécies de *FMVA* conhecidas Gigaspora gigantea (Nicol & Gerd) Gerdemann & Trappe caracteriza-se pela formação de azigosporos globosos ou elipsóides, variações em diâmetro de 353-368 × 345-398 μm, apresentando-se com coloração amarelo-esverdeada e alto conteúdo em lipídeos. Este fungo não forma vesículas intraradiculares, entretanto, formam externamente às raízes células auxiliares equinuladas e em

cachos, SCHENCK & PEREZ (55). Quanto a forma de nutrição os FMVA são considerados simbiontes obrigatórios e não são cultivados em meio de cultura na ausência de planta hospedeira, SIQUEIRA (59). No entanto, relatos de literatura mostram que estudos *in vitro* podem ser realizados com este tipo de fungo, utilizando-se esporos desinfestados superficialmente e alguns aspectos do processo de germinação e início do crescimento são conhecidos, SIQUEIRA *et alii* (65).

A germinação de zigosporos pode ocorrer pela formação de compartimentos periféricos ou pela emissão do tubo germinativo diretamente através da parede do esporo, próximo à base da hifa de sustentação, conforme revisado por SIQUEIRA *et alii* (65).

Em Gigaspora gigantea o processo de germinação é rápido, ocorrendo em torno de 2 a 3 dias, e a presença de mais de um tubo germinativo por esporo tem sido frequentemente observada, KOSKE (37, 38). Os tubos germinativos podem atingir vários centímetros de comprimento e apresentar núcleos distribuídos ao longo da hifa, frequentemente aos pares ou em grupos de três ou quatro, COOKE *et alii* (11).

2.2.2. Crescimento micelial dos FMVA *in vitro*

O crescimento dos FMVA inicia-se pela emergência do tubo germinativo, resultante de mecanismos físicos e enzimáticos balanceados e diferenciados, de acordo com tipo de esporo e espécie de fungo, SIQUEIRA *et alii* (65). Estudos utilizando-se

inibidores metabólicos evidenciam os processos bioquímicos que acompanham a germinação, demonstrando que as principais vias metabólicas e mecanismos de produção de energia são operantes nos esporos em germinação e início do crescimento do tubo germinativo na ausência de raízes vivas (4, 6 e 27).

O mecanismo exato pelo qual os esporos são estimulados a germinar não é conhecido, mas sua germinação é possível tanto em meio de cultura quanto no solo, na ausência de planta hospedeira, não requerendo fatores nutricionais exógenos SIQUEIRA (59). No entanto, a velocidade e a taxa de germinação podem ser influenciados por vários fatores de natureza biótica e abiótica como: dormência e idade do esporo, microorganismos associados, pH, temperatura, potencial de água, luminosidade, tensão de O_2 e CO_2 , compostos orgânicos e inorgânicos (15, 16, 31, 38, 41, 45, 54, 63, 64 e 67). Os elementos nutricionais constituem importantes fatores que influenciam a germinação e crescimento do tubo germinativo em meio de cultura, sendo de fundamental importância conhecê-los de forma a permitir seu entendimento e manipulação. A germinação de esporos tem sido normalmente prejudicada em meios enriquecidos e diferenças quanto aos requisitos nutricionais para a germinação e crescimento estão bem documentados, SIQUEIRA (59). Este fato tem levado os pesquisadores a utilizar esporos pré-germinados em água ou ágar-água em estudos visando o crescimento micelial em meio de cultura, como forma de eliminar o efeito negativo do meio sobre a germinação. Porém, a transferência desses esporos pode

resultar em danos físicos ao tubo germinativo, dificultando seu crescimento posterior, TOMMERUP & KIDBY (68) e KOSKE (38).

Em meio de cultura, o tubo germinativo é capaz de crescer, ramificar-se e diferenciar-se, podendo permanecer ativo por determinado período de tempo, quando então, inicia-se a formação de septos a partir do ápice da hifa, devido à retração do citoplasma, limitando assim seu crescimento. A inabilidade do fungo em crescer continuamente sugere falhas no seu metabolismo catabólico e de síntese, necessitando, provavelmente, de fatores nutricionais exógenos ou "indutores" de crescimento para o seu completo desenvolvimento em meio de cultura, SIQUEIRA (59). Deficiências no processo de replicação do DNA foi também, recentemente postulado, como possível barreira ao desenvolvimento do fungo *in vitro*, BURGGRAAF & BERINGER (8).

Diante desta problemática inúmeros estudos, visando determinar os requerimentos nutricionais durante a fase de crescimento micelial, vem sendo realizados, como forma de buscar subsídios que permitam a definição de meio de cultura capaz de sustentar o crescimento e esporulação dos *FMVA in vitro*. A influência de grande número de compostos inorgânicos e orgânicos, definidos ou indefinidos, sobre o crescimento tem sido verificada, mas variações nas condições de cultivo, espécies de fungos e metodologias utilizadas vem dificultando comparações entre os resultados obtidos e retardando a elucidação dos mecanismos envolvidos na resposta do fungo a fatores nutricionais, SIQUEIRA (59). Contudo, evidências da assimilação e incorporação

de compostos do meio pelos *FMVA* tem sido possíveis com o uso de elementos radioativos (1, 4 e 6), demonstrando a permeabilidade dos esporos e hifas a nutrientes exógenos fornecidos pelos meios de cultura. Além disso, mudanças no volume dos esporos, SIQUEIRA (61), e aumento no conteúdo de lipídeos e no peso seco de esporos durante períodos de incubação em ágar nutriente, BEILBY & KIDBY (5) bem como, recrescimento limitado de hifas destacadas de esporo, HEPPEL (29) evidenciam que a síntese de novo material celular ocorre pela utilização de componentes do meio.

Informações acerca da influência de elementos minerais, principalmente macronutrientes, sobre o crescimento têm mostrado que pequenas quantidades de fósforo e enxofre favorecem o crescimento do fungo, enquanto que potássio não mostra efeito consistente (28, 52 e 64). No entanto, altas concentrações destes nutrientes e metais pesados provocam redução no crescimento fúngico (27, 29, 31 e 38). A assimilação de nitrogênio pelos *FMVA* parece ocorrer preferencialmente na forma amoniacal, AMES *et alii* (1), embora atividade de nitrato redutase tenha sido detectada em *FMVA*, demonstrando sua capacidade em utilizar formas nítricas de nitrogênio, HO & TRAPPE (33). A adição de sais de NaNO_3 , NaNO_2 e NH_4NO_3 ao meio de crescimento não resultou em aumento no crescimento de hifas, MOSSE (45), mas redução em 55% no crescimento micelial de *G. margarita* na presença de NH_4NO_3 foi verificada por SIQUEIRA *et alii* (64). Torna-se no entanto, difícil isolar o efeito de um elemento

mineral sobre o crescimento, pois na forma de composto o íon acompanhante pode influenciar a resposta do fungo, fato verificado para Na^+ e Cl^- que provocam alterações nas características morfológicas das hifas quando presentes no meio em concentrações elevadas, HIRREL (32).

Substratos orgânicos complexos, principalmente exsudatos e extratos de raízes, dialisado de sementes, extrato de levedura e extrato de solo promovem aumentos consideráveis no crescimento e ramificação do tubo germinativo e de hifas (15, 18, 27, 45 e 62). Estes substratos podem conter moléculas na forma de íons inorgânicos, peptídeos, aminoácidos, açúcares simples, ácidos orgânicos, esteróides, lipídeos, vitaminas ou mesmo reguladores de crescimento tendo alto potencial para a nutrição destes fungos mas, por outro lado, devido à sua grande complexidade, dificuldades têm sido encontradas para isolar os fatores responsáveis pelo estímulo ao crescimento micelial. Recentemente, compostos capazes de regular o crescimento destes fungos foram isolados de exsudatos radiculares de plantas deficientes em fósforo e caracterizados quimicamente (J.O. Siqueira, G.R. Safir e M. Nair, comunicação pessoal).

Maior atenção tem sido dada na busca de fontes energéticas para o crescimento micelial e inúmeros açúcares e ácidos orgânicos testados, normalmente não mostram efeito ou promovem redução no tubo germinativo (27, 29 e 64). Contudo, efeito favorável ao crescimento para ácido tartárico, oxálico e cítrico foi relatado por MOSSE (45) e a adição de 4 g/l de sacarose e

0,4 a 0,8 g/l de glicose estimulou o crescimento de G. margarita, SIQUEIRA & HUBBELL (62) e SIQUEIRA *et alii* (64). A ausência de efeito estimulatório sobre o crescimento, frequentemente encontrada pela adição de açúcares, não é claramente entendida. O metabolismo dos carboidratos parece ocorrer normalmente nestes fungos MACDONALD & LEWIS (44), indicando que o suprimento de carbono, provavelmente não é o fator limitante ao crescimento *in vitro*. Entretanto, o fornecimento de compostos nitrogenados, especialmente aminoácidos, aumenta o crescimento micelial em meio de cultura, HEPPEL & JAKOBSEN (30), indicando o requerimento nutricional destes fungos por nitrogênio orgânico. Adição de peptona em concentrações de 1 e 5 g/l favoreceu o crescimento de G. caledonium, HEPPEL (27) mas 1 g/l deste composto mostrou-se inibitório, para G. margarita, SIQUEIRA *et alii* (62). Na tentativa de determinar quais os componentes da peptona responsáveis pelo efeito estimulatório sobre o crescimento, HEPPEL & JACKOBSEN (30) estudaram a influência de vários grupos de aminoácidos constituintes da peptona sobre o crescimento de G. caledonium. Eles evidenciaram grupos de aminoácidos estimulatórios e grupos inibitórios para o crescimento. Cistina, glicina e lisina, nas concentrações de 4,6; 556 e 825 mg/l, respectivamente, foram os mais estimulatórios. O agrupamento dos mesmos permitiu aumento de 5 vezes no crescimento, evidenciando possível efeito sinérgico. A demonstração de efeito inibitório ou ausência de efeito de alguns aminoácidos sobre o crescimento, sugere que o fungo

apresenta requerimento diferenciado para estas fontes de nitrogênio, demonstrando a necessidade de estudos complementares que permitam observar o comportamento do fungo na presença de cada aminoácido em particular.

Outros estudos utilizando-se leucina e acetato marcados isotopicamente, possibilitaram demonstrar que esporos de G. caledonium são capazes de assimilar e incorporar leucina durante a síntese protéica e realizar a síntese de aminoácidos, BEILBY & KIDBY (6). Análise do pool de aminoácidos dos esporos mostrou que asparagina, arginina, ácido glutâmico e glutamina representaram 76% do total de aminoácidos, enquanto que baixas concentrações de glicina, valina e cisteína foram detectadas, indicando pequena síntese destes aminoácidos pelos esporos. Prolina e metionina não apresentaram marcação, o que sugere deficiência no processo de síntese destes aminoácidos e assim poderiam ser fator limitante para a formação e posterior crescimento do tubo germinativo *in vitro*. Contudo, a ausência de síntese de um aminoácido por determinado fungo, pode estar relacionada também a sua alta concentração interna ou à não essencialidade do mesmo no processo de síntese protéica operante em determinada fase do crescimento, GARRAWAY & EVANS (19).

Benefícios de fontes nitrogenadas complexas sobre o crescimento micelial de FMVA são também documentados. Estudos realizados por SIQUEIRA & HUBBELL (62) mostraram através do fracionamento de extrato de solo, que a presença de proteína foi o fator responsável pelo estímulo no crescimento do tubo

germinativo de G. margarita e aumento no crescimento do tubo germinativo de esporos de G. caledonium e G. margarita na presença de tiamina foi também verificado por HEPPEL (27) e SIQUEIRA *et alii* (64). Estes fatos podem estar relacionado com o benefício de alguns microrganismos da rizosfera sobre os *FMVA*, uma vez que eles podem produzir cofatores, liberando-os para a solução do solo, AZCON-AGUILAR *et alii* (2) e WARNER & MOSSE (71).

Diante das evidências existentes foi possível constatar que a adição de certos fatores nutricionais como pequena quantidade de sacarose e glicose, alguns aminoácidos, tiamina, extrato de solo e dialisado de sementes promovem aumentos no crescimento micelial de *FMVA*. Isto indica a capacidade das hifas e esporos em utilizar estes compostos. No entanto, estes estudos não são suficientes para permitir definição de meio de cultura capaz de sustentar abundante crescimento micelial e esporulação dos *FMVA* na ausência de raízes vivas. Isto evidencia a necessidade de maior compreensão dos aspectos nutricionais envolvidos no seu desenvolvimento.

3. MATERIAL E METODOS

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Ciência do Solo da Escola Superior de Agricultura de Lavras e constou de vários experimentos visando avaliar a influência de aminoácidos e de peptona sobre o crescimento micelial de esporos pré-germinados do fungo micorrízico vesículo-arbuscular Gigaspora gigantea *in vitro*. Na primeira etapa foram estudados os efeitos de aminoácidos isoladamente e peptona incorporados ao meio nutritivo, em diferentes concentrações. Na segunda etapa do estudo, aminoácidos previamente selecionados por seus efeitos positivos sobre o crescimento micelial de G. gigantea, foram agrupados em combinações diversas e testados.

3.1. *Obtenção e preparo dos esporos*

A multiplicação dos esporos foi feita pela inoculação em vasos de cultivo com Brachiaria decumbens Stapf Prain e substrato constituído por material de Latossolo Roxo fumigado com Bromex (260 cc/m³ de substrato) os quais foram mantidos em

casa de vegetação por um período de 12 a 14 meses. Os esporos foram extraídos do solo por peneiramento úmido, GERDEMANN & NICOLSON (20), em peneiras com malhas de 0,720 e 0,105 mm de abertura, centrifugação em água a 3.000 rpm durante 3 minutos e em sacarose 45% a 2.000 rpm por 2 minutos, seguindo-se lavagens com jatos de água. Após extração, os esporos foram selecionados em microscópio estereoscópico (20 x) procurando-se homogeneizá-los quanto aos aspectos morfológicos relativos ao tamanho, forma e coloração.

Para desinfestação, os esporos selecionados foram recolhidos em seringas de vidro com capacidade para 20 ml e transferidos para unidades de filtração estéreis, constituídas por membrana de papel (Whatman nº 1), colocada em suporte de filtração tipo "Swinnex" da Millipore. A desinfestação foi feita por lavagem através da injeção de 20 ml de solução de hipoclorito de sódio 1% (V/V, 5% de cloro livre) por 20 minutos, seguido de 20 ml de estreptomicina 100 ppm por 30 minutos, efetuando-se lavagens com água destilada autoclavada após a aplicação de cada solução desinfestante, conforme descrito em COLOZZI-FILHO (10). Em seguida os esporos foram transferidos, com auxílio de pinça de ponta fina, para placas de Petri (9,0 cm) contendo 20 ml de ágar-água Merck 1% (pH 6,4 ± 0,2) para germinação. O ágar foi marcado com perfurador de rolha de 1 cm de diâmetro e colocou-se um esporo ao centro de cada círculo.

As placas foram vedadas com fita plástica adesiva, para evitar desidratação e incubadas em estufa à temperatura de 25 a

28 °C, na ausência de luz, por um período de 2 a 3 dias até a emergência do tubo germinativo. Os esporos livres de crescimento bacteriano e de fungos contaminantes que apresentavam tubo germinativo não superior a duas vezes o seu diâmetro, foram posteriormente transferidos para tubos contendo meio líquido aos quais aplicaram-se os tratamentos de incorporação de aminoácidos a serem estudados. A transferência dos esporos para os tubos de ensaio foi feita pela remoção do círculo de ágar contendo, um esporo germinado e livre de contaminantes, com auxílio de uma espátula de ponta curva, e submergindo-o no meio de cultura. Os tubos foram então incubados em estufa à temperatura de 25 a 28 °C, na ausência de luz, pelo período de 15 dias.

3.2. *Instalação e condução dos ensaios*

Preliminarmente testes para definir um meio nutritivo que permitisse avaliação da resposta do fungo aos aminoácidos foram realizados. A definição do meio nutritivo constou de modificações do meio de HEPPEL (27), tendo a seguinte constituição: KCl (4,0 mg/l); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (4,0 mg/l) $Ca (H_2PO_4)_2$ H_2O (0,8 mg/l); FeNa EDTA (0,19 mg/l); tiamina HCl (0,4 mg/l); biotina (0,04 mg/l); vitamina B_{12} (0,04 mg/l); sacarose P. A (2.000 mg/l).

Todas as vidrarias (erlenmeyers, beckers, pipetas, placas, tubos de ensaio) e utensílios (pinças, estiletes e outros) utilizados no presente estudo foram lavados em água corrente, imersos em solução de HCl 50% e após lavagem em água destilada foram acondicionados individualmente com papel "Craft" e esterilizados em estufa a 150 °C/2 horas.

Os meios de cultura foram preparados utilizando-se água destilada, o pH ajustado para $5,5 \pm 0,2$ e autoclavados a 120 °C por 20 minutos. Soluções estoque de vitaminas, aminoácidos e peptona foram filtradas em filtro de membrana de 0,45 μm e mantidos em geladeira, sendo adicionadas ao meio autoclavado. Foram tomadas aliquotas do meio para avaliação do pH e o meio de cultura foi distribuído em tubos de ensaio de 180 x 14,5 mm colocando-se 3 ml por tubo e os experimentos executados em condições assépticas.

Na primeira etapa do estudo os experimentos constaram da adição de aminoácidos e peptona, individualmente ao meio nutritivo, em diferentes concentrações, conforme apresentado no Quadro 1. As concentrações dos aminoácidos a serem testadas foram estipuladas baseando-se na quantidade de cada aminoácido presente em 1 g/l de peptona, conforme determinado por HEPPEL & JACKOBSEN (30). Como controle utilizou-se o meio básico sem a adição de aminoácido ou peptona. O delineamento estatístico em todos os experimentos foi inteiramente ao acaso e foram utilizadas parcelas experimentais constituídas por 10 tubos, contendo apenas um esporo por tubo e três repetições para cada tratamento.

QUADRO 1. Compostos orgânicos nitrogenados e concentrações incorporadas em meio nutritivo para estudos de crescimento micelial de *G. gigantea* *in vitro*.

Compostos	Concentrações (mg/l)		
	(1)	(2)	(3)
Nitrogenados			
L - Glicina, Merck	139	278	556
L - Lisina, Merck	206,3	412,5	825
L - Acido glutâmico, Pro analysi	27	53,9	107,8
L - Prolina, Merck	17,3	34,5	69
L - Metionina, Merck	4,3	8,6	17,2
L - Acido 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-Haën	1,15	2,3	4,6
L - Cisteína, Merck	1,15	2,3	4,6
L - Arginina, Riedel de-Haën	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

Para experimentos com aminoácidos contendo enxofre $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ presente no meio básico foi substituído por $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ para evitar possível influência do enxofre inorgânico sobre a utilização destes aminoácidos pelo fungo.

Baseando-se nos resultados da primeira etapa do estudo, aminoácidos em concentrações favoráveis ao crescimento fúngico foram agrupados em várias combinações e testados seus efeitos sobre o crescimento.

3.3. Avaliação do crescimento micelial

Após o período de incubação o sobrenadante dos tubos foi colhido para avaliação do PH e foram feitas observações do aspecto morfológico do micélio quanto á presença de septos e células auxiliares, ramificação das hifas e coloração dos esporos, sob microscópio estereoscópico (40x). O micélio de cada parcela contendo 10 esporos foi agrupado, fragmentado e submetido a contagem do número de interseções conforme metodologia modificada de HEPPER & JACKOBSEN (30). Para a fragmentação, o micélio foi transferido para tubo de ensaio de 125/15 mm contendo 50 contas de vidro com diâmetro de 1 mm e o tubo submetido a agitação em Vortex (1/3 da velocidade máxima durante 30 segundos), obtendo-se fragmentos de $0,8 \pm 0,003$ mm de comprimento. Os fragmentos foram filtrados em filtro Millipore quadriculado (9 mm^2 por quadrícula) e então submetidos à contagem em microscópio estereoscópico (40 x). Foram contados os fragmentos que interceptaram as linhas do filtro no sentido horizontal e vertical. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância, utilizando-se os níveis de significância de 5% e 1% para o teste *F*, de acordo com o programa AVBRPOL do Centro de Processamento de Dados da ESAL, usando-se a transformação $Y = \sqrt{t+0,5}$, onde *t* são os dados de contagem. Os resultados que mostraram efeito de aminoácidos sobre o crescimento micelial foram submetidos a análises de regressão, sendo as equações selecionadas pelo teste *F* ao nível de significância de 5%. Aplicou-se o teste de Tukey a 5% para comparação das médias entre os diferentes tratamentos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeitos da adição de aminoácidos e peptona em meio nutritivo sobre o crescimento micelial de G. gigantea

No presente estudo o efeito de 13 aminoácidos e de peptona, adicionados individualmente ao meio nutritivo, sobre o crescimento micelial de G. gigantea revelou efeitos significativos para os aminoácidos leucina, histidina, cistina, fenilalanina, metionina e para peptona conforme análises de variância (Quadro 2).

Os aminoácidos leucina e cistina, mostraram-se estimulatórios para o crescimento, quando presentes em baixas concentrações no meio e não exerceram nenhum efeito em concentrações superiores a 29,2 e 1,15 mg/l, respectivamente (Figura 1A e B). Demonstração da incorporação de leucina no processo de síntese proteica realizada por esporos de Glomus caledonium, BEILBY e BEILBY & KIDBY (6) demonstram a capacidade dos *FMVA* em utilizar este aminoácido diretamente na biossíntese de compostos proteicos essenciais ao crescimento. Além deste fato, o baixo nível de leucina verificado em esporos de G. caledonium, BEILBY & KIDBY (6) sugere que este aminoácido é absorvido e rapidamente metabolizado podendo formar compostos essenciais ao crescimento

QUADRO 2. Análises de variância para número de interseções de hifas nos experimentos de fontes orgânicas de nitrogênio, considerando concentração como fonte de variação, para o fungo *Gigaspora gigantea*. Dados transformados ($Y = \sqrt{t + 0,5}$), ESAL, Lavras - MG, 1989.

Experimentos	GL	Quadrado Médio	Nível Signif. (%)	Coefficiente de Variação (%)
Lisina	(3)	2,1683	52,4787	10
Glicina	(3)	3,8256	62,3330	10
Leucina	(3)	40,4892	0,0401	9
Histidina	(3)	112,2152	0,0151	11
Fenilalanina	(3)	5,4728	1,5726	7
Prolina	(3)	18,4938	83,6162	12
Asparagina	(3)	10,8898	22,8827	11
Arginina	(3)	2,7038	44,3684	14
Metionina	(3)	12,8264	0,3779	9
Cistina	(3)	5,4602	1,4802	8
Cisteína	(3)	38,8040	13,3316	7
Acido glutâmico	(3)	26,0106	24,4897	7
Acido aspártico	(3)	10,4196	37,1782	7
Peptona	(3)	65,0604	1,8196	12

micelial. A capacidade de fungos não micorrízicos em utilizar leucina para o crescimento micelial é amplamente conhecida (12, 24 e 49).

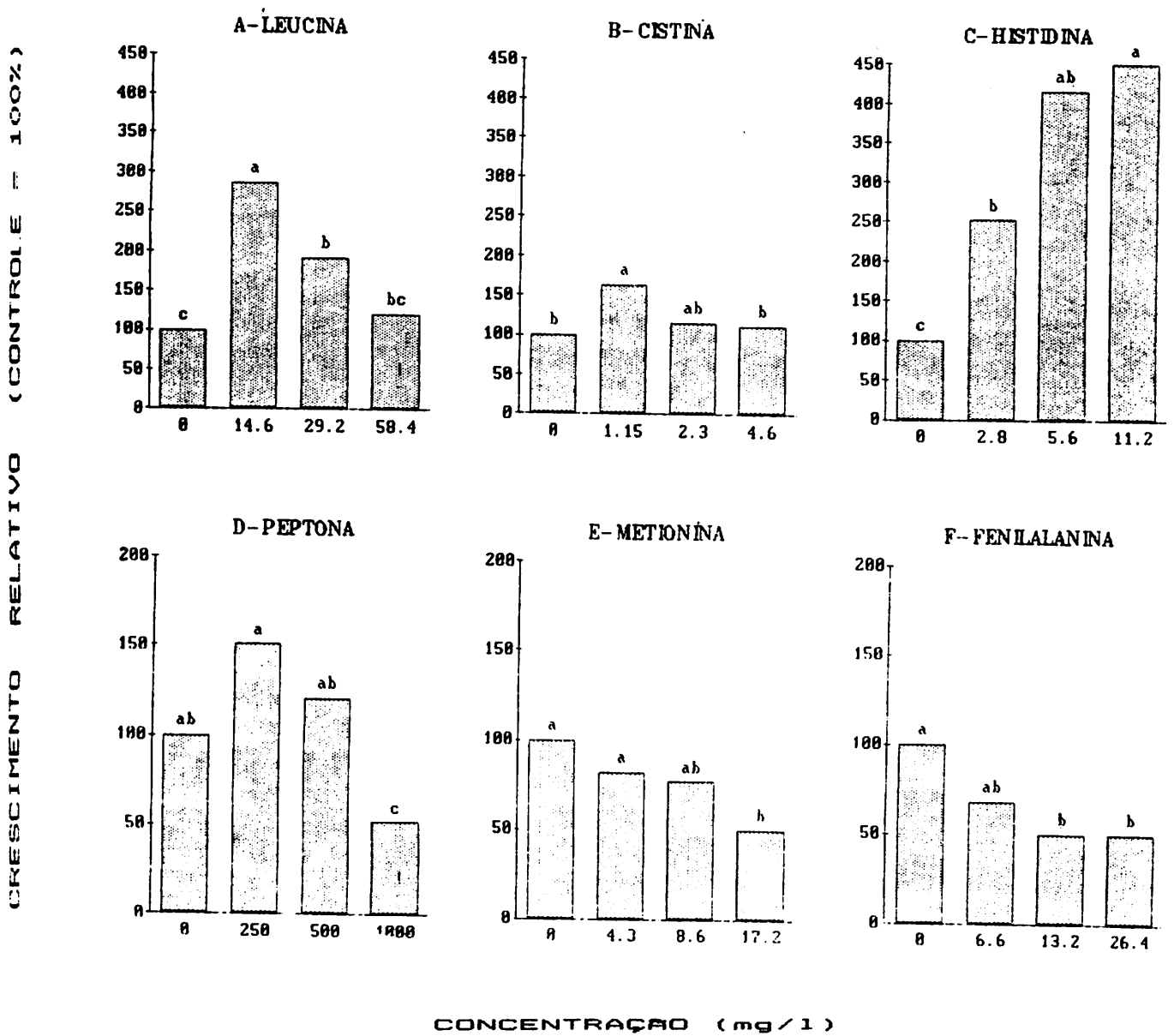


Figura 1. Resposta de *Gigaspora gigantea* à adição de aminoácidos e peptona ao meio nutritivo.

* médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

A degradação de leucina por fungos pode levar à produção de ácidos orgânicos como ácido isovalérico, o qual pode atingir níveis tóxicos aos fungos ou provocar redução no pH do meio de cultura, reduzindo o crescimento micelial, COOL & LEAL (12). Este fato poderia ser uma possível explicação para o menor crescimento de G. gigantea na presença de concentrações mais elevadas de leucina adicionada ao meio. Contudo, o pH final do meio não sofreu acidificação, mostrando-se na faixa de 5,2 a 6,8. Isto leva a pensar que as concentrações de leucina utilizadas não foram suficientes para causar toxidez por ácidos orgânicos, considerando-se que o acúmulo de ácido isovalérico relatado por COOL & LEAL (12) foi verificado em concentrações de leucina muito elevadas no meio (3,9 g/l), comparadas com as testadas no presente estudo.

O benefício de cistina sobre o crescimento micelial de G. gigantea corrobora resultados obtidos por HEPPER & JACKOBSEN (30), em estudos com G. caledonium. No entanto, G. gigantea parece requerer menor quantidade deste aminoácido, refletindo possível diferença na capacidade de absorção e assimilação de cistina entre estas espécies.

Diferenças entre isolados ou espécies de fungos quanto à resposta à incorporação de aminoácidos ao meio é bastante documentada na literatura (12, 23, 26, 43 e 72). Além disso, o fracionamento do micélio de espécies ou isolados crescidos em diferentes meios de cultura tem mostrado que diferenças entre a constituição de aminoácidos são principalmente quantitativas e

não qualitativas, KEDDY & RAO (36) e PELLER & MULLINS (51), demonstrando que o processo de absorção de aminoácidos pode ser pouco específico, mas a taxa de incorporação destes pelas espécies de fungos difere grandemente. As poucas informações existentes acerca dos sistemas de absorção e incorporação de aminoácidos por *FMVA* dificulta comparações desta natureza. Por outro lado, é possível que o menor requerimento de cistina por *G. gigantea* esteja relacionado à maior disponibilidade deste aminoácido em meio líquido utilizado neste estudo, comparado com o meio semi-sólido utilizado por HEPPER & JACKOBSEN (30). Maior contato do aminoácido com as hifas fúngicas pode ter ocorrido no meio líquido, levando à maior absorção deste pelo fungo de modo a satisfazer suas necessidades, mesmo quando presente em baixa concentração no meio.

Os efeitos de histidina e peptona para *G. gigantea* podem ser visualizados na Figura 1 C e D. Nota-se que a resposta a histidina foi positiva e crescente com o aumento das concentrações adicionadas ao meio, podendo este resultado ser atribuído possivelmente à maior absorção do aminoácido pelo fungo. Entretanto, HEPPER & JACKOBSEN (30), obtiveram efeito inibitório de histidina sobre o crescimento micelial de *G. caledonium*, quando incorporado ao meio em concentração de 22,4 mg/l. Estes resultados confirmam que o efeito de histidina é dependente da concentração utilizada. Considerando-se esta dependência, é provável que a utilização de concentrações mais elevadas de histidina, que as utilizadas no presente estudo, pudesse

resultar em suprimento ótimo deste aminoácido para o máximo crescimento de G. gigantea. Por outro lado, a incorporação de doses ainda mais elevadas de histidina ao meio, como utilizadas por HEPPER & JACKOBSEN (30), poderia resultar em inibição do crescimento através de mecanismos ainda desconhecidos em *FMVA*.

No presente estudo houve redução no crescimento micelial de G. gigantea pela adição de 1000 mg/l de peptona e uma tendência em aumentar o crescimento quando baixas concentrações foram adicionadas ao meio de cultura. As informações relativas ao efeito de peptona sobre o crescimento de *FMVA* são contraditórias. Segundo HEPPER (27) 1 e 5 g/l de peptona favoreceram o crescimento de G. caledonium, mas redução de 45% no crescimento de G. margarita na presença de 1 g/l deste polipeptídeo foi verificada por SIQUEIRA *et alii* (64). Neste estudo a porcentagem de inibição sobre o crescimento micelial de G. gigantea observado na presença de 1.000 mg/l de peptona foi de 50% em relação ao controle, valor bem próximo ao encontrado por SIQUEIRA *et alii* (64) para G. margarita. Estes fatos indicam certa variabilidade na resposta a este polipeptídeo por diferentes espécies de *FMVA*, podendo ser reflexo da capacidade diferenciada destes fungos em utilizar os aminoácidos constituintes da peptona durante o seu crescimento.

O benefício de peptona como substrato para fungos tem sido atribuído à capacidade destes organismos em utilizar este polipeptídeo como fonte de C, N e S e pela possível contaminação de sua composição por vitaminas solúveis em água, KAILSZ &

MOORE (35) e ORITSEJAFOR (49). Entretanto, neste estudo é provável que peptona tenha sido utilizada por G. gigantea preferencialmente como fonte de N, uma vez que formas mais disponíveis de carbono e vitaminas são fornecidas pelo meio de cultura, podendo indicar um baixo requerimento deste composto por G. gigantea.

Os efeitos dos aminoácidos metionina e fenilalanina sobre o crescimento micelial de G. gigantea são mostrados na Figura 1 E e F. Verifica-se que a adição destes aminoácidos ao meio, reduziu o crescimento do fungo em todas as concentrações testadas, sendo este efeito significativo nas concentrações de 17,2 mg/l para metionina e a partir de 13,2 mg/l para fenilalanina. As maiores concentrações de fenilalanina e metionina utilizadas, provocaram redução de 50% no crescimento micelial. No entanto, benefício da adição de metionina em meio ágar-água sobre o crescimento de G. caledonium, foi relatado por HEPPEL & JACKOBSEN (30), discordando dos resultados aqui apresentados. Considerando-se que os fungos utilizados por HEPPEL & JACKOBSEN (30) e neste estudo pertencem a gêneros distintos e que as condições experimentais são também diferenciadas, a confirmação dos efeitos de metionina sobre o crescimento micelial dos *FMVA* merece estudos adicionais. As equações de regressão para aminoácidos e peptona anteriormente discutidos são apresentadas no Quadro 3.

Os aminoácidos lisina, glicina, cisteína, ácido glutâmico, ácido aspártico, prolina, asparagina e arginina não

QUADRO 3. Equações de regressão para número de interseções de hifas nos experimentos de fontes orgânicas de nitrogênio para o fungo *Gigaspora gigantea*. Dados transformados ($Y = \sqrt{t+0,5}$), ESAL, Lavras - MG, 1989.

Composto	Regressão	r ²	P
Leucina	$12,76 + 0,38x - 6,6 \times 10^{-3}x^2$	0,63	P ≤ 0,05
	$11,67 + 1,20x - 0,05x^2 + 5,4 \times 10^{-4}x^3$	1,00	P ≤ 0,01
Cistina	$25,50 + 2,80x - 0,61x^2$	0,32	P ≤ 0,05
	$24,30 + 14,15x - 8,54x^2 + 1,20x^3$	1,00	P ≤ 0,01
Histidina	$14,18 + 1,14x$	0,79	P ≤ 0,01
Fenilalanina	$18,08 - 0,59x + 0,01x^2$	0,99	P ≤ 0,05
Metionina	$29,71 - 0,48x$	0,97	P ≤ 0,01
Peptona	$27,71 + 20,87x - 26,66x^2$	0,91	P ≤ 0,05

influenciaram significativamente o crescimento de *G. gigantea* (Quadro 2). No entanto, pode-se observar uma tendência de cisteína, ácido aspártico, glicina e de asparagina em favorecer o crescimento, promovendo aumentos de até 35, 27, 23 e 20% no número de interseções, respectivamente (Figura 2). O benefício de cisteína pode estar relacionado com a possível oxidação deste aminoácido no meio para a forma de cistina, HEPPEL & JACKOBSEN (30), favorável ao crescimento.

A ausência de respostas do fungo a determinados aminoácidos pode ser atribuída a três possíveis fatores:

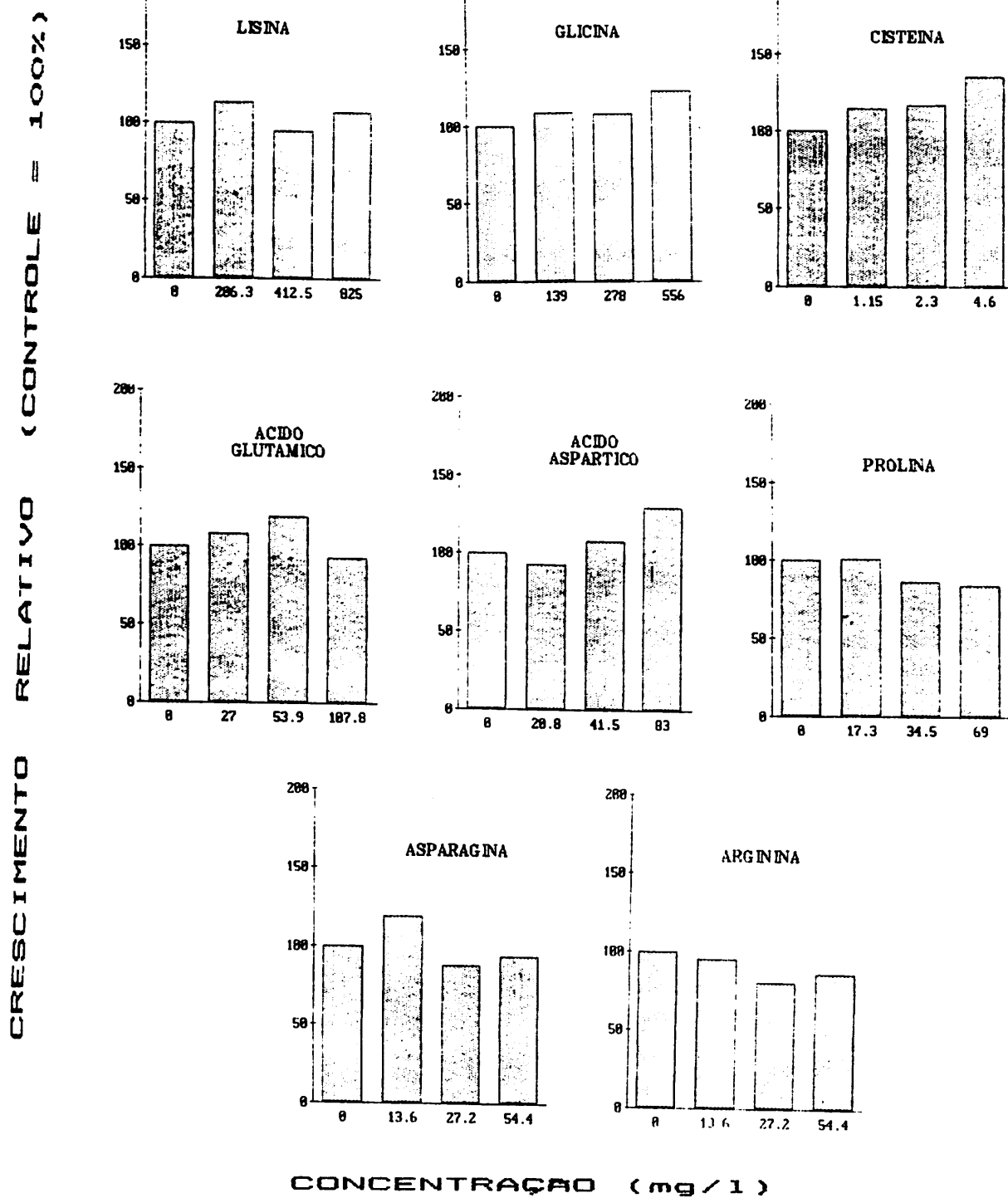


Figura 2. Efeito de compostos orgânicos nitrogenados sobre o crescimento micelial de *Gigaspora gigantea*.

a) inabilidade das hifas em absorver estes aminoácidos; b) alta reserva interna destes aminoácidos no esporo; c) não essencialidade dos mesmos para a síntese proteica em determinada fase de crescimento. Segundo GARRAWAY & EVANS (19) a concentração de aminoácidos livres na célula pode inibir a absorção adicional de aminoácidos fornecidos pelo meio, por um fenómeno denominado transinibição. GRIFFIN (22) considera que a inibição na absorção de aminoácidos exógenos pode ser devida à capacidade de aminoácidos internos em reduzir a mobilidade de carreadores e assim, diminuir o número de sítios de ligação disponíveis para o transporte de aminoácidos. Sabendo-se que os aminoácidos asparagina, ácido glutâmico e arginina apresentam-se em altas concentrações no interior de esporos de *FMVA*, BEILBY & KIDBY (6) é possível que estes fenómenos estejam ocorrendo, reduzindo, portanto, a absorção destes aminoácidos por *G. gigantea*. Considera-se também que aminoácidos podem ser absorvidos por fungos não sendo incorporados em proteínas, BARRAN (3) e NICHOLAS (46). Neste caso, a absorção de aminoácido pode não refletir em aumentos no crescimento do fungo, GLEASON (21), dificultando a detecção de efeitos destes compostos através de medições de crescimento micelial. Isto demonstra que a ausência de resposta a aminoácidos pode não estar relacionada com o processo de absorção dos mesmos, mas a confirmação deste pressuposto requer estudos fisiológicos e bioquímicos mais acurados.

A análise de variância para os dados do experimento sobre incorporação de leucina, cistina, histidina, individualmente ou combinados ao meio mostrou efeitos significativos (Quadro 4). No entanto, os diferentes tratamentos não diferiram pelo teste de Tukey 5% (Figura 3). A combinação dos aminoácidos que no experimento anterior mostraram efeitos estimulatórios, não resultou em aumentos no crescimento, revelando ausência de efeito sinérgico.

No presente estudo, apesar da tentativa de uniformização das condições de multiplicação do inóculo (substrato e planta hospedeira), foram observadas diferenças na taxa de germinação de esporos e no crescimento micelial, entre os esporos utilizados na primeira fase do estudo e os esporos utilizados no experimento de combinação de aminoácidos. Na primeira fase destes estudos, visando detectar os efeitos de cada aminoácido sobre o crescimento, micelial, verificou-se baixa taxa de germinação. Além disto os esporos germinavam lentamente sendo acompanhados normalmente de crescimento lento das hifas, indicando uma baixa atividade destes esporos. Observações semelhantes foram relatadas por TOMMERUP (67) onde esporos de Acaulospora laevis com baixa taxa de germinação eram capazes de pequeno crescimento das hifas. Na segunda fase do estudo, visando avaliar os efeitos de aminoácidos combinados sobre o crescimento, verificou-se elevada e rápida germinação. Estes esporos apresentaram também crescimento rápido das hifas.

QUADRO 4. Análise de variância do experimento de combinação de aminoácidos. Dados transformados $(Y = \sqrt{t + 0,5})$, ESAL, Lavras-MG, 1989.

Fator Variação	GL	Quadrado Médio	Nível Significância(%)
Tratamento	(7)	11,8209	3,0079
Erro	(16)	3,8559	
C.V.	6,83 %		

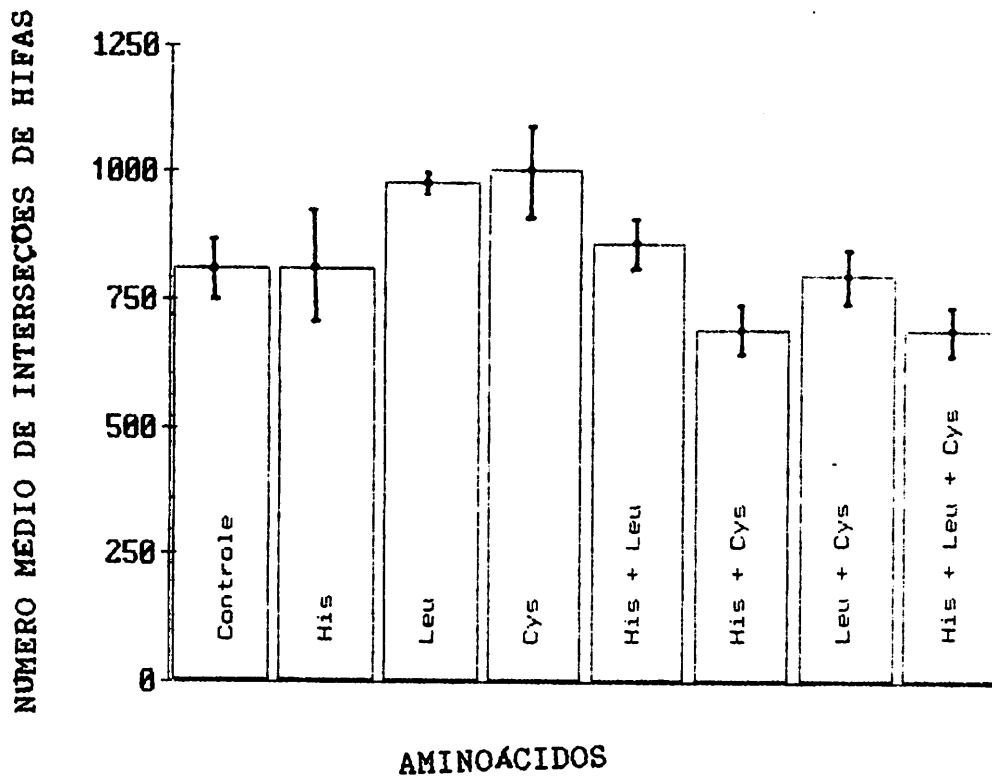


Figura 3. Efeito dos aminoácidos, His=histidina (11,2 mg/l); Leu=leucina (14,6 mg/l); Cys=cistina (1,15 mg/l) e sua combinação sobre o crescimento micelial de *Gigaspora gigantea*.

* Erro padrão da média

Assim, é possível que na primeira fase, a baixa atividade fisiológica dos esporos tenha limitado a síntese dos aminoácidos leucina, histidina e cistina em quantidade suficiente para promover rápida germinação e pronunciado crescimento das hifas. Portanto, o suprimento externo com estes aminoácidos resultou em aumento significativo no crescimento das hifas naqueles experimentos mas não nos últimos, onde a alta atividade fisiológica dos esporos permitiu a síntese de leucina, histidina e cistina em quantidade suficiente para promover rápida germinação e crescimento de hifas, sem requerimento exógeno destes aminoácidos. Diante disto, é possível que após os 15 dias de incubação, estes esporos tenham atingido crescimento máximo das hifas e que o fator limitante ao seu crescimento não seja atribuído a estes aminoácidos. Portanto, a magnitude de resposta ao suprimento externo destes aminoácidos pode ser diretamente dependente do estado de atividade fisiológica dos esporos e de sua velocidade de síntese de aminoácidos.

Outro ponto que pode-se considerar é o fato de que o benefício do suprimento de aminoácidos para fungos que estão crescendo através da metabolização de suas reservas nitrogenadas internas parece bastante pequeno, GARRAWAY & EVANS (19). Isto evidencia que o benefício de alguns aminoácidos para o crescimento de *G. gigantea* pode ter sido pouco expressivo sendo imperceptível pelo método de avaliação de crescimento utilizado no presente trabalho.

O efeito diferenciado de aminoácidos sobre o crescimento dos *FMVA* observado anteriormente por HEPPEL & JACKOBSEN (30) e confirmado no presente estudo, indica que propágulos destes fungos podem ser influenciados pela planta hospedeira, uma vez que a composição de aminoácidos na rizosfera varia com a nutrição e espécie de planta, SCHWAB *et alii* (56 e 57), podendo este fato refletir na capacidade de alongação das hifas por *FMVA* e no estabelecimento e manutenção da simbiose.

4.2. Aspectos morfológicos do crescimento micelial de *G. gigantea* na presença de compostos orgânicos nitrogenados

Após a desinfestação alguns esporos mostraram-se escurecidos, com tonalidade marrom escuro, resultante provavelmente, da alta sensibilidade aos agentes desinfestantes. Esporos com estas características tornaram-se inviáveis.

Durante a fase de pré-germinação pôde-se verificar que a germinação dos zigosporos de *G. gigantea* ocorreu pela emissão de um ou mais tubos germinativos através da parede do esporo, conforme ilustrado na Figura 4 A. Os tubos germinativos cresceram geralmente na superfície do ágar penetrando ocasionalmente no meio, mas frequentemente, foram encontrados tubos germinativos aéreos, normalmente com aspecto vazio.

A taxa de germinação entre os lotes de esporos utilizados nos diversos experimentos foi variável e esporos jovens

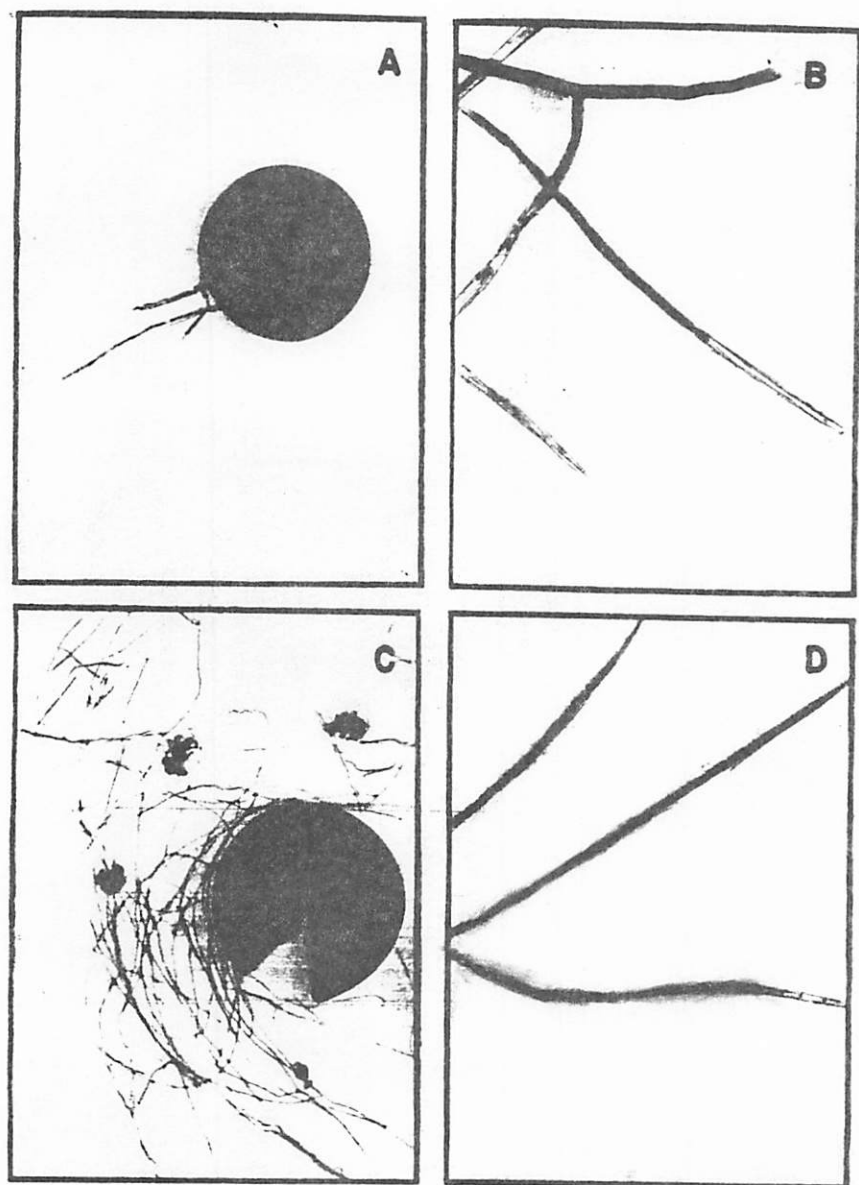


Figura 4. Azigosporo de *Gigaspora gigantea* germinado em ágar - água (A), retração citoplasmática da hifa (B), crescimento micelial e células auxiliares (C), hifas com citoplasma intermitente e septadas (D).

de coloração amarelo pálido ou esverdeado mostraram-se geralmente inviáveis, fato também relatado por KOSKE (37).

A produção do micélio ocorreu através da alongação das hifas, sendo o micélio caracterizado por pequeno número de ramificações. No entanto, a presença de hifas finas com elevado número de ramificações terminais, formando estruturas semelhantes a arbúsculos puderam ser observados ocasionalmente, parecendo ser influenciada pelos compostos orgânicos nitrogenados e concentrações estudadas (Quadro 5). A ocorrência de crescimento de hifas com presença de finas ramificações terminais tem sido relatada por outros autores, e.g. Le TACON *et alii* (41). MOSSE (45), propõe que estas ramificações constituem órgãos de absorção de nutrientes em FMVA. Dessa forma, a ocorrência destas estruturas poderia estar envolvida com a absorção dos nutrientes do meio, principalmente se considerarmos que as mesmas podem apresentar permeabilidade diferenciada aos compostos adicionados.

Ao final do período de incubação observou-se no micélio, a presença de células auxiliares e de hifas com citoplasma descontínuo ou com pronunciada retração citoplasmática nas extremidades, acompanhadas de septação (Figura 4B, C e D).

O número de células auxiliares no micélio foi também influenciado por certos aminoácidos (Quadro 5). Embora esta característica tenha mostrado muita variação entre os esporos, os aminoácidos histidina e cisteína e peptona favoreceram a produção de células auxiliares. É possível que o número de

QUADRO 5. Características morfológicas de esporos de *Gigaspora gigantea* em meio nutritivo contendo diferentes compostos orgânicos nitrogenados. ESAL, Lavras-MG, 1989.

Compostos / Concetração	Ramificações Terminais**				Mediana de C. Auxiliares				Número Total de Esporos Escuros			
	* 0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Glicina	+	-	+	-	3	1	1	0	1	6	1	2
Lisina	-	+	-	-	1	0	0	0	8	12	11	4
Prolina	+	+	+	+	1	0	0	0	0	0	0	0
Metionina	+	+	-	+	3	0	1	0	1	0	0	1
Fenilalamina	-	+	+	+	0	0	0	0	1	2	8	8
Histidina	-	+	+	+	2	0	4	2	2	4	5	5
Cistina	-	-	-	-	1	1	0	2	2	0	0	0
Cisteína	-	-	-	-	0	7	1	5	2	0	0	0
Arginina	+	+	+	+	1	0	2	0	0	0	1	4
Asparagina	+	-	+	+	1	0	0	0	0	1	0	1
Leucina	-	-	-	-	2	0	0	0	2	2	3	1
Acido glutâmico	-	+	+	+	0	0	0	0	0	1	0	0
Acido aspártico	-	-	-	+	3	0	0	0	0	0	0	0
Peptona	-	+	+	-	0	2	1	0	1	6	17	20

* Vide Quadro 1 material e métodos

** (+) presença de ramificações, (-) ausência de ramificações

células auxiliares verificado na presença destes compostos esteja relacionado ao aumento no crescimento micelial obtido por estes tratamentos pois, aparentemente, esporos que apresentam grande volume de hifas demonstram maior potencial para produzir células auxiliares, PAULA (50).

Após o período de incubação alguns esporos apresentaram coloração marrom escura e produziram volume de hifas relativamente menor que esporos normais. Esta característica foi também influenciada pelos tratamentos (Quadro 5). Aumentos no número de esporos escuros foram acentuados nos meios com adição de fenilalanina e peptona, nas concentrações 2 e 3. Este efeito coincide com redução no crescimento micelial e parece refletir alguma desordem nos processos fisiológicos e bioquímicos que acompanham o crescimento micelial.

Mudanças na parede e coloração de esporos têm sido relacionadas com o processo de envelhecimento desses esporos resultando normalmente em inviabilidade destes propágulos, KOSKE (37) e HARDIE (25). Considerando-se o curto tempo de incubação dos esporos no presente estudo, é provável que este período não tenha sido suficiente para determinar seu envelhecimento. Assim, o escurecimento de alguns esporos pode ter sido determinado pelo tratamento aplicado. Como é um fenômeno pouco estudado, sua base não é ainda conhecida.

4.3. *Considerações finais*

Benefícios sobre o crescimento micelial de *G. gigantea* puderam ser observados pela incorporação dos aminoácidos, histidina, leucina e cistina ao meio de cultura, indicando a capacidade do fungo em utilizar estes compostos para o crescimento

das hifas. Peptona, em baixas concentrações, proporcionou menor estímulo ao crescimento que os aminoácidos histidina, leucina e cistina, os quais permitiram aumentos no crescimento micelial de 360; 186 e 63%, respectivamente. Isto indica que peptona pode conter algum aminoácido que tenha efeito depressivo sobre o crescimento do fungo, fato que foi verificado para os aminoácidos fenilalanina e metionina no presente estudo e observado também por HEPPER & JACKOBSEN (30) para alguns grupos de aminoácidos. Contudo, a presença destes aminoácidos na constituição da peptona não invalida o benefício deste composto para este fungo, quando concentrações adequadas são fornecidas ao meio de cultura.

Os fungos têm capacidade de absorver e assimilar determinados aminoácidos, enquanto outros não são utilizados ou são prejudiciais ao seu crescimento, sendo os mecanismos envolvidos nesses processos ainda pouco conhecidos. No presente estudo, nenhuma relação parece existir entre a utilização de aminoácidos por *G. gigantea* com a polaridade e estrutura destes compostos. Tanto aminoácidos de cadeia simples (leucina e cistina) como de cadeia cíclica (histidina) favoreceram o crescimento do fungo. Esta ausência de relação entre estrutura do aminoácido e sua utilização tem sido relatada para outros fungos, DAVIES (17) e SUMER (66), indicando que a absorção de aminoácidos por estes organismos ocorre normalmente por sistemas de transporte pouco específicos. Entretanto, sistema de transporte específico para determinado aminoácido pode existir, GARRAWAY & EVANS (19).

Diante disto, torna-se bastante difícil especificar as razões pelas quais *G. gigantea* responde diferentemente aos aminoácidos sulfídricos, cistina e metionina. Esta resposta pode estar na dependência da concentração utilizada. Contudo, sabendo-se que os sistemas de transportes destes aminoácidos e sua biossíntese são diferenciados em fungos, GARRAWAY & EVANS (19) e UMBARGER (70), sendo estes aminoácidos absorvidos ou sintetizados por mecanismos independentes, torna-se difícil compará-los sem a elucidação dos mecanismos bioquímicos.

Apesar do benefício de alguns compostos orgânicos como vitaminas, proteínas, aminoácidos e alguns açúcares sobre o crescimento dos *FMVA*, o fator limitante ao seu crescimento *in vitro* não foi ainda elucidado.

Essa incapacidade dos *FMVA* em crescer em meio de cultura tem provocado grande especulação por parte dos pesquisadores no intuito de desvendar os fatores responsáveis por esta limitação. A existência de bloqueio ou falha bioquímica no processo metabólico essencial ao crescimento não simbiótico, tem sido lançada como hipótese para a ausência de crescimento. No entanto, as principais vias metabólicas e mecanismos de produção de energia podem ser demonstradas durante a germinação e início do crescimento de hifas, não existindo evidências de lesões no metabolismo que impeçam o crescimento do fungo (4, 6 e 27). Isto leva a pensar que esta falha no crescimento se deve a limitações genéticas do fungo, possivelmente devido a perda de parte de seu material genético ou repressão do genoma, necessitando de

interação com o metabolismo do hospedeiro para o seu desenvolvimento, BURGGRAAF & BERINGER (8) SIQUEIRA (59). Contudo, a taxa e extensão da síntese de macromoléculas pelos *FMVA*, necessitam ser determinadas por métodos mais precisos, antes que alguma conclusão definitiva possa ser feita acerca da habilidade desses fungos para sintetizar material suficiente para o contínuo crescimento micelial e esporulação, na ausência de raízes vivas.

J. O. SIQUEIRA e colaboradores (comunicação pessoal), isolaram recentemente, de exsudatos radiculares, compostos capazes de regular o crescimento destes fungos. Isto poderá ajudar na obtenção dos mesmos em meio de cultura, de forma a permitir a realização de estudos mais detalhados sobre a fisiologia e nutrição dos *FMVA*.

É provável que os *FMVA* tenham requerimentos nutricionais distintos, mas isto não invalida os conhecimentos obtidos em relação à nutrição e metabolismo de uma determinada espécie, pois se conseguido o crescimento de uma espécie em cultura axênica, obter-se-iam valiosas informações as quais poderiam ser utilizadas para suceder na cultura de outras espécies de interesse científico e comercial.

5. CONCLUSÕES

- Os aminoácidos histidina, leucina e cistina favoreceram o crescimento micelial de G. gigantea, tendo como concentrações mais favoráveis neste estudo, 11,2; 14.6 e 1.15 mg/l respectivamente.

- A adição de 1000 mg/l de peptona ao meio de cultura provocou redução no crescimento micelial.

- Concentrações elevadas dos aminoácidos fenilalanina e metionina, inibiram o crescimento de Gigaspora gigantea.

- Os efeitos tanto estimulatórios dos aminoácidos leucina, histidina e cistina quanto inibitórios de fenilalanina, metionina e da peptona foram dependentes das concentrações utilizadas.

- A combinação dos aminoácidos histidina, leucina e cistina, em concentrações favoráveis ao crescimento não resultou em efeito sinérgico sobre o crescimento micelial.

- Alguns aminoácidos provocaram alterações morfológicas no fungo.

6. RESUMO

Efeitos de Aminoácidos e Peptona Sobre o Crescimento Micelial de Gigaspora gigantea in vitro

M. H. de Freitas

Os fungos micorrízicos vesículo-arbusculares têm despertado grande interesse, devido aos seus efeitos benéficos na nutrição e desenvolvimento das plantas. No entanto, o seu caráter biotrófico obrigatório e as poucas informações existentes acerca da nutrição e fisiologia destes fungos, vem dificultando a sua multiplicação em cultura pura e limitando consequentemente, sua utilização em larga escala na agricultura. No presente estudo avaliaram-se os efeitos *in vitro* de fontes orgânicas nitrogenadas, sobre o crescimento micelial de esporos pré-germinados de Gigaspora gigantea, visando obter subsídios para a definição de meio de cultura capaz de sustentar seu crescimento e esporulação. Os aminoácidos, glicina, histidina, leucina, lisina, fenilalanina, asparagina, arginina, cisteína, cistina, metionina, prolina, ácido aspártico, ácido glutâmico e peptona foram adicionados, individualmente em meio líquido, em diferentes concentrações. Foram selecionados os aminoácidos e

concentrações favoráveis ao crescimento, os quais foram agrupados e testados em diversas combinações. Após um período de 15 dias de incubação dos esporos, foram avaliados sob microscópio estereoscópico os aspectos morfológicos do micélio e o crescimento micelial foi quantificado através do método de interseções de hifas. Os aminoácidos, histidina, cistina e leucina favoreceram o crescimento micelial de *G. gigantea*, enquanto fenilalanina, metionina e peptona inibiram o crescimento, sendo esses efeitos dependentes das concentrações utilizadas. O agrupamento de aminoácidos estimulatórios, não resultou em efeito sinérgico sobre o crescimento micelial. Alterações morfológicas, quanto a ramificação de hifas, quantidade de células auxiliares produzidas e coloração dos esporos, foram observadas na presença de alguns aminoácidos.

7. SUMMARY

Effects of Amino Acids on the Mycelial growth of Gigaspora gigantea in vitro.

M. H. de Freitas

The vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi have attracted great interest, because of their beneficial effects on the nutrition and growth of crops. However, their obligatory biotrophical character and the little information available on their nutrition and physiology have made the multiplication of these fungi difficult in pure culture. This fact has limited the application of these fungi in large scale agriculture. In the present study, the effects of organic nitrogenous compounds on the *in vitro* mycelial growth of pré-germinated spores of Gigaspora gigantea were studied in order to obtain support for the definition of culture media able to sustain their growth and sporulation. The amino acids glycine, histidine, leucine, lysine, phenylalanine, asparagine, arginine, cysteine, cystine, methionine, proline, aspartic acid, glutamic acid and peptone were added individually, in different concentrations, to a liquid medium. The amino acids and concentrations beneficial mycelial to growth were selected, grouped and tested in several

combinations. After 15 days, the morphology of the mycelium was observed under dissecting microscope and the mycelial growth quantified by the hyphal intersection method. The amino acids histidine, cystine and leucine improved the mycelial growth of G. gigantea, while phenylalanine and methionine and peptone inhibited the growth, their effects being dependent on the concentrations used. The grouping of stimulatory amino acids did not result in synergistic effects on the mycelial growth. Morphological alterations of hyphal branching, amount of auxiliary cells formed, and spore color were observed in the presence of some amino acids.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. AMES, R. N.; REID, C. P. P.; PORTER, L. K. & CAMBARDELLA, C. Hyphal uptake and transport of nitrogen from two ^{15}N - labelled sources by Glomus mosseae, a vesicular - arbuscular mycorrhizal fungus. The New Phytologist, London, 95(3):381-96, Nov. 1983.
02. AZCON-AGUILAR, C.; DIAZ-RODRIGUES, R. M. & BAREA, J. M. Effect of soil micro-organisms on spore germination and growth of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus Glomus mosseae. Transaction of the British Mycological Society, London, 86(2): 337-40, Mar. 1986.
03. BARRAN, L. R. Uptake of glutamate by chamydospores of Fusarium sulphureum. Transaction of the British Mycological Society, London, 87(3):441-4, Oct. 1986.
04. BEILBY, J. P. 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, Ottawa, 28(7): 623-8, July 1982.

05. BEILBY, J. P. Effects of inhibitors on early protein, RNA, and lipid synthesis in germinating vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores of Glomus caledonium. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 29(7):596-601, July 1983.
- 06.----- & KIDBY, D.K. Biochemistry of ungerminated and germinated spores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. Glomus caledonium: changes in neutral and polar lipids. Journal of Lipid Research, Bethesda, 21:739-50, 1980.
07. BRUNETT, M. C.; PICHE, Y. & PETERSON, R. L. A developmental study of the early stages in vesicular-arbuscular mycorrhizal formation. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 63(2):184-94, Feb. 1985.
08. BURGGRAAF, A. J. P. & BERINGER, J. E. Absence of nuclear DNA synthesis in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi during *in vitro* development. The New Phytologist, London, 111(1):25-33, Jan. 1989.
09. CHATTOPADHYAY, N. C. & NANDI, B. Nutrition in Fusarium moniliforme var. subglutinam causing mango malformation. Mycologia, New York, 73(3):407-14. May/June 1981.

10. COLLOZI-FILHO, A. Desinfestação superficial de esporos de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares. Lavras, ESAL, 1988. p.80 (Tese MS)
11. COOKE, J. C.; GEMMA, J. N. & KOSKE, R. E. Observations of nuclei in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Mycologia, New York, 79(2):331-3, Mar./Apr. 1987.
12. COOL, J. & LEAL, J. A. Utilization of L-leucina a nitrogen source by fungi. Transactions of the British Mycological Society, London, 59(1):104-14, Aug. 1972.
13. COX, G.; SANDERS, F. E.; TINKER, P. B. & WILD, J. A. Ultrastructural evidence relating to host - endophyte transfer in a vesicular-arbuscular mycorrhiza. In: SANDERS, F. E.; MOSSE, B. & TINKER, P. B.; eds. Endomycorrhizas. London, Academic Press, 1975. p.297-312.
14. CRABTREE, S. L. & GESSNER, R. V. Growth and nutrition of the salt-marsh fungi Pleospora gaudefroyi and camarosporium roumeguerii. Mycologia, New York, 74(4):640-7, July/Aug. 1982.

15. DANIELS, B. A. & GRAHAM, S. D. Effects of nutrition and soil extracts on the germination of Glomus mosseae spores. Mycologia, New York, 68(1):108-16, Jan./Feb. 1976.
16. ----- & TRAPPE, J. M. Factors affecting spore germination of the VAM fungus, Glomus epigaeus. Mycologia, New York, 72(3):457-71, May/June 1980.
17. DAVIES, M. E. The nutrition of Phytophthora fragariae. Transactions of the British Mycological Society, London, 42(2):193-200, 1959.
18. ELIAS, K. S. & SAFIR, G. R. Hyphal elongation of Glomus fasciculatus in response to root exudates. Applied and environmental Microbiology, Washington, 53(8):1928-33, Aug. 1987.
19. GARRAWAY, M. O. & EVANS, R. C. Fungal nutrition and Physiology. New York, John Willey & Sons, 1984. 401p.
20. GERDEMANN, J. W. & NICOLSON, T. H. Spores of micorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. Transactions of the British Mycological Society, London, 46:235-44, 1963.

21. GLEASON, F. H. Uptake of amino acids by saprolegnia. Mycologia. New York, 65(2):465-8, Mar/Apr. 1973.
22. GRIFFIN, D. H. Fungal Physiology. New York, John Wiley & Sons, 1983. 383 p.
23. ----- ; QUINN, K. & McMILLEN, B. Regulation of hyphal growth rate of Hypoxylon mammatum by amino acids: Stimulation by proline. Experimental Mycology, New York, 10:307-14, 1986.
24. GROVER, R. K. The effect of amino acids on growth and sporulation of Aspergillus flavus and their carry-over for subsequent spore germination. The New Phytologist, London, 63(1):12-20, Jan. 1964.
25. HARDIE, K. Germination of Glomus mosseae spores isolated from stock pots of different ages. Transactions of the British Mycological Society, London, 83(4):693-6, Dec. 1984.
26. HASIJA, S. K. & AGARWAL, H. C. Nutritional physiology of Trichothecium roseum. Mycologia, New York, 70(1):47-60, Jan./Feb. 1978.

27. HEPPER, C. M. Germination and growth of Glomus caledonium spores: The effects of inhibitors and nutrients. Soil Biology Biochemistry, Oxford, 11(3):269-77. May./June 1979.
- 28.----- . Inorganic sulphur nutrition of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus Glomus caledonium. Soil Biology Biochemistry. Oxford, 16(6):669-71, Nov./Dec. 1984.
- 29.----- . Limited independent growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *in vitro*. The New Phytologist, London, 93(4):537-42, Apr. 1983.
- 30.----- & JACKOBSEN, I. Hyphal growth from spores of the mycorrhizal fungus Glomus caledonius: effect of amino acids. Soil Biology Biochemistry, Oxford, 15(1):55-8. Jan./Feb. 1983.
- 31.----- & SMITH, G. A. Observations on the germination of Endogone spores. Transactions of the British Mycological Society, London, 66(2):189-94, Apr. 1976.
32. HIRREL, M. C. The effect of sodium and chloride salts on the germination of Gigaspora margarita. Mycologia New York, 73(4):610-7, July/Aug. 1981.

33. HO, I. & TRAPPE, J. M. Nitrate reducing capacity of two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Mycologia, New York, 67(4):886-8, July/Aug. 1975.
34. HSIEH, W. H.; SNYDER, W. C. & SMITH, S. N. Influence of carbon sources, amino acids, and water potential on growth and sporulation of Fusarium moniliforme. Phytopathology, ST. Paul, 69(6):602-4, June 1979.
35. KALISZ, H. M. & MOORE, D. Protein utilization by basidiomycete fungi. Transactions of the British Mycological Society, London, 86(4):519-25, June 1986
36. KEDDY, M. N. & RAO, A. S. Amino acids in mycellium and culture filtrates of Rhizoctonia Solani. Transactions of the British Mycological Society, London, 64(3):527-8, June 1975.
37. KOSKE, R. E. Gigaspora gigantea: Observations on spore germination of a VA-mycorrhizal fungus. Mycologia, New York, 73(2):288-300, Mar./Apr. 1981.
38. -----, Multiple germination by spores of Gigaspora gigantea. Transactions of the British Mycological Society, London, 76(2):328-30, Mar. 1981.

39. LANDECKER, E. M. Fundamentals of the fungi. 2 ed. New Jersey, Printice-Hall, 1982. 578p.
40. LEAL, J. A. & GOMES-MIRANDA, B. Effect of amino-acids and organic acids on the sexual reproduction of species of Phytophthora e Pythium. Transactions of the British Mycological Society, London, 50(1):77-84, 1967.
41. LE TACON, F.; SKINNER, F. A. & MOSSE, B. Spore germination and hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. Glomus mosseae. (Gerdeman and Trappe) under decreased oxygen an incresead carbon dioxide concentrations. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 29(12):280-5, Dec. 1983.
42. LILLY, V.G. The chemical environment for fungal growth. In: AINSWORTH, G. C. & SUSSMAN, A.S. The fungi. New York, Academic Press, 1965. V₁, p.465-79 (The fungal cell).
43. LOPES, M. E. & FERGUS, C. L. The carbon and nitrogen nutrition of Fusarium roseum. Mycologia, New York, 57(6):897-903, Nov./Dec. 1965.
44. MacDONALD, R. M. & LEWIS, M. The ocurrence of some acid phosphatases and dehydrogenases in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus Glomus mosseae. The New Phytologist, London, 80(1):135-41, Jan. 1978.

45. MOSSE, B. The regular germination of resting spore and some observation on the growth requirements of an Endogone sp. causing vesicular-arbuscular mycorrhiza. Transactions of the British Mycology Society, London, 42:273-86, 1959.
46. NICHOLAS, D. J. D. Utilization of inorganic nitrogen compounds and amino acids by fungi. In: AINSWORTH, G.C. & SUSSMAN, A. S. The fungi. New York, Academic Press. 1965. p.349-76.
47. NICOLAS, G. & VILLANUEVA, J. R. Physiological studies on the rust hyperparasite Dalurca filum. I. carbon and nitrogen nutrition. Mycologia, New York, 57(5):782-8, Sept./Oct. 1965.
48. OLUFOLAJI, D. B. Sporulation on growth of Curvularia pallescens as effected by media, temperature, and nitrogen sources. Phytopathology, St Paul, 74(3):260-3, Mar. 1984.
49. ORITSEJAFOR, J. J. Carbon and nitrogen nutrition in relation to growth and sporulation of Fusarium oxysporum. F. SP. Elaedis. Transactions of the British Mycological Society, London, 87(4):519-24, Dec. 1986.

50. PAULA, M. A. Germinação e crescimento micelial de esporos de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares na presença de calos e suspensão de células vegetais *in vitro*. Lavras, ESAL, 1988. p. 128. (Tese MS).
51. PELLER, T. C. & MULLINS, J. T. Nitrogen nutrition in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorus*. *Mycologia*. New York, 74(2):334-7, Mar./Apr. 1982.
52. PONS, F. & GIANINAZZI-PEARSON, V. Influence du phosphore, du potassium, de l'azote et du pH sur le comportement *in vitro* de champignons endomycorrhizogènes à vésicules et arbuscules. *Cryptogamie, Micologie*, Paris, 5:87-100, 1984.
53. ROEPER, R.A. & FRENCH, J.R. Growth of the ambrosia fungus *Ambrosiella hartigii* on various nitrogen sources. *Mycologia*, New York., 78(1):202-4, Jan./Feb. 1981.
54. SCHENCK, N. C.; GRAHAM, S. O. & GREEN, N.E. Temperature and light effect on contamination and spore germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia*, New York, 67(6):1189-92, Nov./Dec. 1975.
55. SCHENCK, N.C. & PEREZ, Y. Manual for the identification of V. A. Mycorrhizal fungi. Gainesville, University of Florida, 1987. 245p.

56. SCHWAB, S. M.; LEONARD, R. T. & MENGE, J. A. Qualitative and quantitative comparison of roots exudates of mycorrhizal and non mycorrhizal plant species. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 6:1227-31, June 1984.
57. -----, 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, Rockville, 73(3):761-5, Nov. 1983.
58. SINGH, N. & WASINI, A. A. Effect of nutrition on growth and sporulation of a tropical isolate of Pilolobus crystallins. Mycologia, New york, 72(3):558-63, May/June. 1980.
59. SIQUEIRA, J. O. Cultura axênica e monoxênica de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares. in: REUNIAO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 2, São Paulo, 1987. Programas e resumos... São Paulo, SEMA/SEAG/USP, 1987. p. 44-70.
60. ----- . Micorrizas: forma e função. In: REUNIAO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 1. Lavras, 1986. Anais... Lavras, ESAL/FAEPE, 1986, p. 5-32.

61. SIQUEIRA, J. O. Nutritional and edaphic factors affecting spores germination, germ tube growth and root colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Gainesville, University of Florida, 1983. 159p. (Dissertação Ph.D).
- 62.----- & HUBBELL, D. H. Effect of organic on germination and germ tubes growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus spores *in vitro*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília. 21(5):523-7, Maio 1986.
- 63.-----; -----; KIMBROUGH, J. W. & SCHENCK, N. C. Stachybotrys chartarum antagonistic to azygospores of Gigaspora margarita *in vitro*. Soil Biology Biochemistry, Oxford, 16(6):679-81. June 1984.
- 64.-----; ----- & SCHENCK, N. C. spore germination and germ tube growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *in vitro*. Mycologia, New York, 74(6):952-9, Nov./Dec. 1982.
- 65.----- ; SYLVIA, D.M.; GIBSON, J. & HUBBELL, D.H. Spores, germination and germ tubes of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 31(11):965-72, Nov. 1985.

66. SUMNER, J. L. Growth and sporulation of Mucor pusillus. Transactions of the British Mycological Society, London, 55(2):283-92, Oct. 1970.
67. TOMMERUP, I. C. Spore dormancy in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Transactions of the British Mycological, London, 81(1):37-45, Aug. 1983.
68. ----- & KIDBY, D. K. Preservation of spores of vesicular-arbuscular endophytes by L-drying. Applied Environmental Microbiology, Washington, 37(4):831-5, Apr. 1979.
69. TRAPPE, J. M. & SCHENCK, N. C. Taxonomy of the fungi forming endomycorrhizal. In: SCHENCK, N.C. Methods and principles of mycorrhizal research. St. Paul, The American Phytopathological Society, 1982. p.1-9.
70. UMBARGER, H. E. Amino acid biosynthesis and its regulation. Annual Review Biochemistry. Palo Alto, 47:533-606, 1978.
71. WARNER, A. & MOSSE, B. Independent spread of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. Transactions of the British Mycological Society, London, 74(2):407-46, Apr. 1980.

72. WEAVER, D. J. Growth and production of microsclerotia of two Cylindrocladium species with various carbon and nitrogen sources. Canadian Journal Botany, Ottawa, 52(7):1665-8, July 1974.
73. WEBER, D. J. & OGAWA, J. W. The specificity of proline in the germination of spores of Rhizopus arrhizus. Phytopathology, St. Paul, 55(3):262-5, Mar. 1965.
74. WHITAKER, A. Amino acid transport into fungi: An Essay. Transactions of the British Mycological Society, London, 67(3):365-76, Dec. 1976.
75. ZAMBOLIN, L. & SIQUEIRA, J. O. Importância e potencial das associações para a agricultura. Belo Horizonte, EPAMIG, 1985. 36p. (Documentos, 26).