

GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DO FUNGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR *Acaulospora* sp. *IN VITRO*

Vanessa Fogaça de Freitas, Martha Viviana Torres Cely, Galdino Andrade

Universidade Estadual de Londrina <vanessaf_freitas@hotmail.com>

Resumo - O fungo micorrízico arbuscular é um microrganismo simbiote obrigatório que promove o crescimento da maioria das plantas através de diferentes mecanismos que incluem a absorção de nutrientes, proteção contra patógenos e tolerância a diferentes condições de estresse. Isto os converte em uma importante ferramenta biotecnológica com alto grau de aplicação na área agrícola e florestal. Diante disso, foi analisado o potencial de desenvolvimento *in vitro* da estirpe *Acaulospora* sp. visando a viabilização da produção de inoculantes. A partir de uma curva de pH e a incubação a 25 °C e 28 °C, padronizou-se o pH 6,0 como ideal para a germinação do esporo em temperatura de 28 °C. Em relação a característica de germinação, não houve um padrão, alguns esporos apresentaram mais de um tubo germinativo, e hifas com estrutura ramificada. A respeito da quebra de dormência, a manutenção do esporo em temperatura de 4 °C em geladeira por um dia aumentou a porcentagem de germinação. Ao testar diferentes meios de culturas foi observado que meios complexos, como o meio MSR e a adição de exsudados de raízes em Agar água não favoreceram o crescimento da hifa logo após a germinação. Meios com substrato de solo proporcionou uma alta contaminação e uma nula germinação. O Agar água MES, favoreceu uma alta porcentagem de germinação, e crescimento de hifas, demonstrando que o tampão é importante para o desenvolvimento de *Acaulospora* sp. Portanto, neste estágio do seu ciclo de vida, o esporo necessita apenas de condições físicas adequadas para seu desenvolvimento inicial.

Palavras-Chave: Simbiose, dormência, crescimento do micélio, cultivo monoaxênico.

GERMINATION AND GROWING OF THE MYCORRHIZAL FUNGUS *Acaulospora* sp. *IN VITRO*

Abstract - The mycorrhizal fungus is a mandatory symbiont microorganism that promotes growing in the majority of plants through different mechanisms including nutrient uptake, protection against pathogens and tolerance to different stress conditions. This converts them into an important biotechnological tool with high degree of application in agriculture and forestry. According to that, the *in vitro* development potential of *Acaulospora* sp. lineage was analysed, aimed the inoculants production. From the pH curve and 25 °C and 28 °C incubation, the pH 6.0 was standardized as ideal for spore germination in 28 °C. Speaking of germination characteristics, there was no pattern, some spores occurred to present more than one germ tube and hyphae with brached structure. About dormancy break, keeping the spore in low temperatures (4 °C) for one day increased the germination percentage. When tested different culture mediums it was observed that complex mediums, like MSR and the adiction of root exudates in water Agar doesn't favor the hyphae growing after germination. Culture mediums with soil substrate provided high contamination and low germination. The water Agar MES, favored a high germination percentage, and hyphae growing, proving the tampon to be important for the *Acaulospora* sp. Development. Therefore, in the initial stage of the life cycle, the spore requires only physical conditions to germination.

KeyWord: Symbiosis, dormancy, mycelial growth, cultivation monoxenic.

1. INTRODUÇÃO

Os fungos micorrízicos arbusculares são micro-organismos simbiotes obrigatórios que promovem o crescimento da maioria das plantas facilitando ao seu hospedeiro a absorção de nutrientes. Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) auxiliam principalmente na absorção de fosfato para as plantas e em troca, como são seres heterotróficos, adquirem carbono a partir de fotoassimilados do hospedeiro (FITTER, HELGASON & HODGE, 2011); além de favorecer a agregação do solo e a resistência a estresse biótico e abiótico. Esta interação ocorre em cerca de dois terços das plantas terrestres (FITTER & MOYERSON, 1996). Devido a estes benefícios, o interesse pela cultura *in vitro*, como ferramenta para a obtenção de inoculantes puros em grande escala tem sido crescente, com o intuito de substituir a utilização de adubos químicos. Em estudos prévios, realizados por nosso grupo de pesquisa, o gênero *Acaulospora* tem mostrado um alto efeito no desenvolvimento de espécies arbóreas, mas a cultura *in vitro* deste tem sido pouco explorada. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do pH e temperatura na germinação do fungo micorrízico arbuscular, *Acaulospora* sp, e o efeito de meios complexos e substrato de solo no desenvolvimento das hifas visando ampliar as informações a respeito deste gênero e do seu desenvolvimento *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Origem, Seleção e Desinfecção de Propágulos

Este estudo foi feito sob uma estirpe do fungo micorrízico *Acaulospora* sp isolado da rizosfera da espécie arbórea *Schizolobium parahyba* var *amazonicum*. A multiplicação deste fungo foi feita em vasos com solo e areia na proporção 1:1 e *Brachiaria decumbens* como planta hospedeira. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação com temperatura entre 25 e 28 °C e incidência de luz natural até a propagação do fungo.

Para os testes *in vitro* utilizaram-se esporos maduros provenientes dos vasos de multiplicação. Estes foram extraídos por peneiramento úmido e decantação segundo Gerdemann & Nicolson (1963). Após a extração, a superfície dos esporos foi desinfetada em sistema de filtração utilizando uma solução de Cloramina T 2% e Streptomycina 0,02% por 20 minutos segundo Mosse (1962). Posteriormente, a germinação destes esporos foi avaliada em diferentes condições.

2.2. Quebra de dormência e Germinação de Propágulos

Para a quebra de dormência dos esporos foi testado o efeito do armazenamento em baixa temperatura em duas situações: i) armazenamento direto do inoculo proveniente dos vasos de multiplicação por diferentes períodos (7, 31 e 77 dias) em câmara fria (4 °C), ii) armazenamento em câmara úmida a 4 °C por diferentes períodos (1, 4, 7, 15 e 21 dias) após a extração e seleção direta dos vasos de multiplicação.

2.3 Curva de pH

Foi feita uma curva de pH em meio de cultura Agar água MES (CARR & HINKLEY, 1985) com 5 pHs diferentes (5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5) para determinar quais as condições respeito a este parâmetro que iriam favorecer uma maior porcentagem de germinação dos esporos a uma temperatura de 25 °C. Posteriormente a esta primeira curva de pH, foi realizada uma segunda curva já excluindo as condições que não foram favoráveis na primeira situação avaliando então o feito da incubação a 28 °C.

2.4 Meio de Germinação

Foram testados seis meios de germinação com diferentes composições: M1: Agar água MES; M2: Agar água; M3: Estrato de solo; M4: Estrato de solo MES; M5: Meio mineral mínimo (MSR), M6: Meio com exsudados de raiz. Para os meios que contem extrato de solo foi realizada suspensão do solo utilizado nos vasos de multiplicação, já o meio contendo exsudados radiculares foi preparado a partir de uma cultura de raízes em meio líquido. Diferenças entre as porcentagens de germinação foram analisadas estatisticamente pelo teste Qui-quadrado utilizando o programa Biostat 4.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Quebra de Dormência

Os esporos de FMA presentes no solo podem ficar inativos por um intervalo de tempo indeterminado, variando este tempo de espécie para espécie. Esta dormência seria a não germinação do esporo mesmo em presença de condições químicas e físicas favoráveis (TOMMERUP, 1983). E este período de dormência pode dificultar os estudos realizados com esporos *in vitro* (SAFIR et al., 1990). Por isso, foram estudadas formas de quebra de dormência para acelerar a germinação do esporo. Esta quebra foi realizada a partir da manutenção do propágulo em baixas temperaturas, em diferentes

períodos de tempo (Tabela 01).

Na primeira condição estabelecida para a quebra de dormência, os esporos foram mantidos no substrato do solo em temperatura de 4 °C. Aqueles que foram extraídos do solo depois de serem armazenados por uma semana em temperatura baixa, apresentaram taxa de germinação maior comparada aos esporos que foram extraídos após 31 dias. Mas, em relação à média do tempo de germinação, este apresentou germinação mais rápida, demonstrando que uma exposição mais prolongada a baixas temperaturas, reduziu o tempo de iniciação da germinação. No entanto, após 77 dias de manutenção do inóculo a 4 °C, a germinação foi nula, pois os esporos já estavam inviáveis.

Tabela 01 Média do período para iniciar a germinação dos esporos em diferentes situações de quebra de dormência.

Origem do Inoculo	Tempo de Armazenamento (dias)	Tempo Câmara úmida a 4° C*	Porcentagem de germinação	Tempo médio de germinação (dias)
Inoculo armazenado a 4° C	77	1	0%	-
	31	1	15%	10
	7	1	18%	12
Vasos de multiplicação	0	21	0	-
	0	15	0	-
	0	7	0	-
		4	21%	9
		1	56%	14

*Após a extração e seleção de esporos

Quando analisado o efeito da quebra de dormência com o esporo isolado mantido em câmara úmida a 4 °C; os esporos que permaneceram até 4 dias nestas condições apresentaram maiores porcentagens de germinação quando comparados aos que foram armazenados com solo a temperatura de 4 °C. Neste caso não houve um padrão para o tempo de iniciação de germinação, podendo ser observado uma variação grande na média. A partir do sétimo dia, não foi evidenciado germinação dos esporos mantidos em câmara úmida, isto pode ser explicado pelo fato destes ficarem por um tempo prolongado na ausência de condições favoráveis para a manutenção da sua viabilidade. Assim, pode-se considerar que a manutenção em câmara úmida em temperatura de 4 °C por um curto intervalo de tempo favorece a germinação dos esporos da estirpe de *Acaulospora* sp. estudada; diferentemente de outras espécies que demonstram uma maior tolerância tais condições como *A. laevis*, para a qual esporos depois de extraídos do solo foram armazenados a 6 °C durante pelo menos 6 semanas antes da germinação e mantiveram-se viáveis (HEPPER, 1984).

3.2 pH e Temperatura de Germinação

O pH mais adequado para o desenvolvimento do FMA em cultura *in vitro* está relacionado com o pH

do solo no qual o fungo foi extraído. Na curva de pH de *Acaulospora* sp., pode-se notar que o pH 6,0 proporcionou uma maior porcentagem de germinação tanto em temperatura a 25 °C quanto a 28 °C (Figura 01). Ao ser medido o pH do solo do vaso de multiplicação foi conferido que constava em torno de 6,0 concordando com o trabalho realizado por Siqueira et al. (1985) em que relata que a germinação de esporos de fungo FMA é afetado pelo pH do solo e que a maioria das espécies de *Acaulospora* apresentam um pH ácido ideal para o seu desenvolvimento.

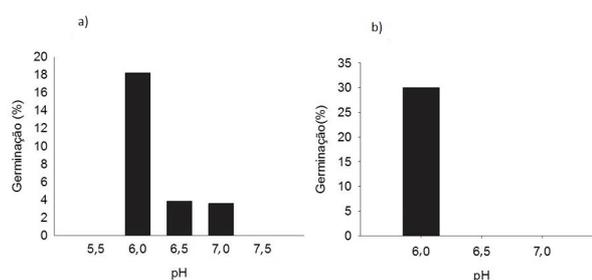


Figura 01: Porcentagem de germinação da espécie *Acaulospora* sp em diferentes valores de pH e condições de temperaturas. a) 25° C, b) 28° C.

No entanto, apesar de *Acaulospora* sp apresentar maior porcentagem de germinação em pH ácido, pH 6,0 está mais próximo do neutro, diferindo da espécie *Acaulospora laevis*, que obteve seu maior potencial de germinação num pH entre 4,0 a 5,0 (HEPPER, 1984).

Em relação à temperatura ideal para a germinação constatou-se que a temperatura de 28 °C foi a mais adequada, pois os esporos que foram incubados em 25 °C exibiram porcentagem inferior de germinação, demonstrando que esta espécie se desenvolve melhor em temperaturas mais altas (Figura 01). Resultados semelhantes foram encontrados para espécie *Acaulospora hemii* para a qual a temperatura ótima de germinação foi 27 °C, em cultura *in vitro* (DALPÉ & DECLERCK, 2002).

3.3 Caracterização da Germinação

A média de iniciação da germinação do esporo foi após 10 dias de incubação na placa de Petri em condições ideais de desenvolvimento, como pode ser conferido na Tabela 01, diferentemente de *A. rahmii* (DALPÉ & DECLERCK, 2002), em que os primeiros esporos germinaram 15 dias após a incubação.

A respeito das características relacionadas à germinação do esporo, pode ser evidenciado, conforme as setas indicam na Figura 02 a; b, que grande parte dos esporos germinou a partir de mais de um tubo germinativo, esta característica também foi descrita na germinação de *A. rahmii* (DALPÉ & DECLERCK, 2002) e de *Gigaspora albida*, que apresentou tubos germinativos múltiplos, que

segundo o autor, está relacionando como uma estratégia de sobrevivência dos fungos FMAs (MAIA & YANO-MELO, 2001).

Além disso, apresentaram um padrão de hifas ramificadas, como pode ser observado na Figura 02 c; d, concordando com o estudo de Dodd, et al. (2000) em que relata que espécies do gênero *Acaulospora* apresentaram hifas irregulares e ramificadas. No entanto, alguns esporos apresentaram hifas com um desenvolvimento desordenado, e isto pode ter ocorrido por algum fator desfavorável presente no meio.

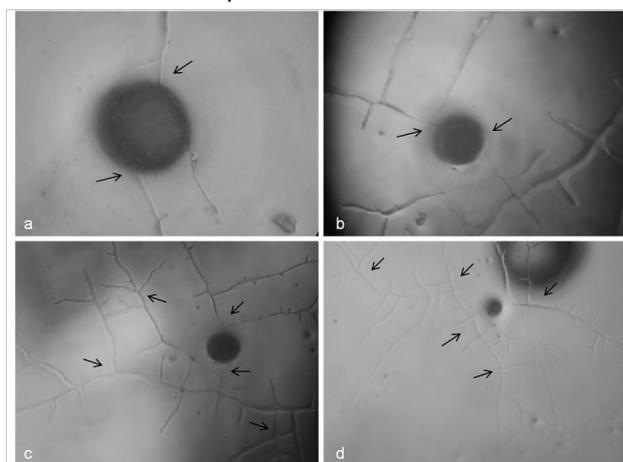


Figura 02 Esporos em diferentes estágios de crescimento in vitro. a) Esporo após ser inoculado em cultura monoaxênica (aumento de 1000x no M.O.). b) 3º dia de desenvolvimento (aumento de 400x no M.O.). Nos campos A e B as setas indicam os tubos germinativos. c) 8º dia de desenvolvimento (aumento de 100 X no M.O.). d) 21º dia de desenvolvimento (aumento de 40 X no M.O.). Nos campos C e D as setas apontam para as ramificações das hifas.

3.4. Teste de Germinação e Contaminação em Diferentes Meios de Cultura

Foram testados diferentes condições de meios de cultura para analisar se havia um meio mais favorável para o desenvolvimento do propágulo.

Tabela 02 O efeito de vários meios na germinação dos esporos de *Acaulospora* sp.

Meios	Germinação (%)
Agar-água	10
Agar-água (solo)	0
Agar MES (solo)	0
Agar MES	23,4
MSR	64,7

No meio Agar água pode-se observar que a taxa de germinação foi muito pequena comparado ao meio que continha o tampão MES e a porcentagem de contaminação foi maior (Tabela 02). Ao acompanhar o desenvolvimento dos esporos que germinaram nestas condições, foi possível notar que ao lançar a

hifa e esta ao entrar em contato com o meio o crescimento foi nulo, revelando que o tampão é indispensável para o desenvolvimento do FMA, concordando com o trabalho de Silva, Melo e Maia (2007) em que relatam a importância do tampão para a manutenção do pH e estímulo do crescimento da hifa. Na propagação *in vitro* de *Glomus etunicatum* o meio Agar água com a adição de MES foi o mais favorável para a germinação do esporo e crescimento do micélio (PAWLOWSKA, 1999)

Com base nos mesmos padrões de cultivo testou-se o efeito do solo que foi retirado dos vasos de multiplicação de *Acaulospora* sp. e adicionado em meio de cultura. Porém nestas condições não houve germinação (Tabela 02), indicando que o solo não beneficiou o desenvolvimento do fungo, além de ter favorecido uma alta porcentagem de contaminação tanto na presença, quanto na ausência do tampão MES (Tabela 03).

Tabela 03 Porcentagem de contaminação dos esporos em diferentes meios de cultura.

Meios	Contaminação (%)
Agar-água	15
Agar-água (solo)	42,11
Agar MES (solo)	50
Agar MES	4,26
MSR	17,65

O meio complexo MSR foi testado para avaliar o efeito da composição deste (vitaminas, minerais e fontes de carbono) sobre a germinação e o desenvolvimento das hifas. Apesar de apresentar uma germinação de 19,05% (Tabela 03), foi observado que a hifa cessou seu crescimento logo após a germinação.

Em relação ao meio com exsudados de raízes, tentava-se aproximar a condição rizosférica presente no solo. Neste caso, a germinação dos esporos foi de 11,54% (Tabela 03), e proporcionou características de crescimento da hifa semelhante ao ocorrido em meio MRS. Com isso, é possível inferir que a germinação de *Acaulospora* sp. não é dependente de condições químicas para o seu desenvolvimento, diferentemente de *G. etunicatum*, em que os exsudados derivados de plantas podem estimular a germinação, e os flavonóides liberados pela planta atuam como reguladores de germinação (PAWLOWSKA, 1999). Assim, para o crescimento inicial do micélio, pode não ser necessário à presença de muitos elementos no meio, mas depois de certo período, é importante o contato com a raiz.

Concordando com Cardoso, Nogueira (2007) que relata a importância da presença de exsudados de raízes para a estimulação da produção de micélio.

Dessa maneira, pode-se evidenciar que há diferenças significativas no efeito da composição dos diferentes meios de culturas sob a germinação dos esporos, sendo comprovado por análise estatística pelo teste do Qui-quadrado ($X^2 = 184,49$; $p < 0,0001$). A respeito da porcentagem de contaminação dos esporos em diferentes meios de culturas também foi comprovado que há diferenças significativas ($X^2 = 78,27$; $p < 0,0001$). Assim, o meio Agar-água MES *Acaulospora* sp. apresentou uma baixa taxa de contaminação (Tabela 03) e uma maior porcentagem de germinação entre as demais condições (Tabela 02), concordando com o trabalho de Daniels & Graham (1976), aonde foi observado que a germinação foi maior em meio Agar água Bacto, o que levou a concluir que a germinação melhora conforme aumenta a pureza do Agar (MAIA & YANO-MELO, 2001).

4. CONCLUSÕES

A partir da análise destes resultados, pode-se deduzir que a espécie *Acaulospora* sp. exibiu melhor germinação em pH 6.0 na temperatura de 28 °C, em meio Agar água MES. Em relação à quebra de dormência, ocorreu maior taxa de germinação ao ser incubada isoladamente, em temperatura de 4 °C, por um curto período de tempo, pois se passar de 5 dias, a germinação pode ser nula, mostrando alta sensibilidade ao frio. A respeito do meio de cultura ideal para a germinação e propagação inicial foi o Agar água MES evidenciando que esta espécie de fungo micorrízico não necessita de compostos orgânicos e substâncias complexas para o seu desenvolvimento inicial. Estes resultados contribuem para uma melhor compreensão sobre as características de germinação e propagação inicial deste gênero, porém é preciso continuar as pesquisas com o objetivo de padronizar as condições ideais para o estabelecimento da associação micorrízica desta espécie *in vitro*.

REFERÊNCIAS

CARR, G. R.; HINKLEY, M.A. Germination and hyphal growth of *Glomus caledonium* on water-agar containing Benomyl. **Soil Biol. Biochem.**, v.17, p. 313-316, 1985.

CARDOSO, E. J. B. N.; NOGUEIRA, M. A. A rizosfera e seus efeitos na comunidade microbiana e na nutrição de plantas. In: **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2007. p. 79-96.

DALPÉ, Y.; DECLERCK, S. Development of *Acaulospora rehmsii* spore and hyphal swellings under root-organ culture. **Mycologia**, v. 94, n. 5, p.850-855, 2002.

DANIELS B. A.; GRAHAM S. O. Effects of nutrition and Soil extracts on germination of *Glomus mosseae* spores; **Mycologia**, v. 68, p. 108-116, 1976.

DODD, J.C. et al. Mycelium of Arbuscular Mycorrhizal fungi (AMF) from different genera: form, function and detection. **Plant and Soil**, v. 226, p. 131-151, fev. 2000.

FITTER, A. H.; MOYERSON, B. Evolutionary trends in root-microbe symbioses. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, v.351, p.1367-1375, 1996.

FITTER, A. H.; HELGASON, T.; HODGE, A. Nutritional exchanges in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: Implications for sustainable agriculture. **Fungal Biology Reviews**, New York, v. 25, p.68-72, 2011.

GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, J. H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet-sieving and decanting. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, v.46, p. 235-244, 1963.

HEPPER, C. M. Regulation of spore germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora laevis* by soil pH. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, v.83, n. 01, p. 154-156, 1984.

MAIA L. C.; YANO-MELO A. M. Germination and Germ Tube Growth of the Arbuscular Mycorrhizal Fungi *Gigaspora albida* in Different Substrates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 281-285, nov. 2001.

MOSSE, B. The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizae under aseptic conditions. **J. Gen. Microbiol.**, v.27, p. 509-520, 1962.

PAWLOWSKA, T. E.; DOUDS JUNIOR, D. D.; CHARVAT, I. In vitro propagation and life cycle of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus etunicatum*. **Mycol. Res.**, v. 103, n.12, p. 1549-1556, 1999.

SAFIR, G. R. et al. Improvement and synchronization of VA mycorrhiza fungal spore germination by short-term cold storage. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 22, n.1, p. 109-111, 1990.

SIQUEIRA, J. O. et al. Spores, germination, and germ tubes of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Can. J. Microbiol.**, v. 31, p. 965-972, ago. 1985.

SILVA, F. S. B.; YANO-MELO, A. M.; MAIA, L. C. Produção e infectividade de inóculo de fungos micorrízicos multiplicado em substrato suplementado com tampão Tris-HCl. **Braz. J. Microbiol.**, v. 38, n. 4, dez, 2007.

TOMMERUP, I. C. Temperature relations of spore germination and hyphal growth of vesicular- arbuscular mycorrhizal fungi in soil. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, v. 81, n. 2, p. 381-387, 1983.