

## ESTUDOS FISIOLÓGICOS E PRODUÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZEOS

Álvaro Alberto De Araújo<sup>1</sup> & Sevastianos Roussos<sup>2</sup>

<sup>2</sup>IRD (anciennement ORSTOM) - Institut de la Recherche pour le Développement, Laboratoire de Microbiologie, Université de Provence, CESB/ESIL Case 925. 163, Avenue de Luminy, F-13288 Marseille cedex 9. FRANCE <sup>1</sup> Bolsista CNPq/Brasília - BRASIL

**Palavras chaves:** Fungo, crescimento apical, *Pisolithus*, *Suillus*, fisiologia, meio agar

### RESUMO

Neste trabalho estudou-se a fisiologia de fungos ectomicorrízicos tais como *Suillus* e *Pisolithus*, cultivados em meio agar. Os objetivos principais são: produção de pré-inóculo para a micorrização de plantas jovens e desenvolvimento de técnicas para o tratamento das amostras possibilitando analisar o consumo de açúcar, produção de enzimas e biomassa produzida. Numa primeira etapa, verificou-se a influência da temperatura, do pH e de sais de magnésio no crescimento apical dos fungos ectomicorrízicos. Em seguida, desenvolveu-se uma técnica para o tratamento das amostras em meio agar, utilizando uma película de celofane onde pode se analisar separadamente o meio agar da biomassa (fungo que cresceu sobre a película de celofane). Esta técnica permite, entre outros, avaliar o consumo de glicose com o crescimento do fungo, a produção de enzimas e a quantidade de biomassa produzida. Estas técnicas assim como o cultivo/produção de fungos micorrízicos podem ser aplicadas para o caso das endomicorrizas do café.

Neste trabalho, apresentamos uma técnica para o estudo de parâmetros de crescimento de fungos sobre meio agar. Placas de Petri de 60 mm de diâmetro, contendo 10 ml de meio de cultura sobre o qual se depositou um disco de papel celofane fim de permitir a separação fácil do micélio após crescimento. Para a análise da produção de biomassa fúngica, um disco de papel celofane previamente estéril, é depositado sobre a superfície do meio de cultura nas placas de Petri. A inoculação é realizada colocando-se um pedaço de micélio no centro do disco de celofane e as culturas são incubadas à 25°C na obscuridade. O crescimento radial da colônia é medido e a biomassa (peso seco) produzida é determinada. Ao meio de cultura, 90 ml de água destilada é adicionada e tudo é homogeneizado com a ajuda do Potter (Bioblock Scientific) para as análises de açúcares redutores e pH. O consumo de açúcar, variação do pH e produção de biomassa após 5, 10 e 15 dias de incubação à 25 °C para as linhagens de *Suillus collinitus* e *Pisolithus tinctorius* em diferentes meios de cultura (PDA, BAF, MNM, MP, GM8, MG) são mostrados neste trabalho. Esta técnica está bem adaptada às culturas dos fungos e permite avaliar o consumo de açúcar e nitrogênio, os perfis de pH, a produção de biomassa, enzimas e pigmentos.

### INTRODUÇÃO

Microorganismos estão presentes em grande quantidade junto às raízes de plantas, e eles possuem um papel importante em inúmeros processos fisiológicos. Pelmont (1) afirma que estes processos dinâmicos são mediados por associações de microorganismos participantes nas atividades das raízes tais como a fixação de nitrogênio e a mobilização do fósforo. Mousain (2,5) e Strullu (3) afirmam que as associações simbióticas predominantes nas raízes das plantas são de origem bacteriana como *Rhizobium* ou de origem fúngica no caso das micorrizas. Marx and Cordell (4) definiram as micorrizas como união estável baseada em trocas recíprocas entre as raízes das plantas e os fungos, cada um otimizando seu desenvolvimento graças a essa associação. Mousain *et al.* (5) relataram que fungos ectomicorrízicos tais como *Lactarius* Pers.,

*Pisolithus* Alb. & Schwein., e *Suillus* P. Karst., são considerados como microorganismos fundamentais para a melhora qualitativa das árvores nos programas de reflorestamento.

De Araújo *et al.* (6) estudaram o efeito do meio de cultura, do pH inicial, e da concentração de sais no crescimento apical de quatro fungos ectomicorrízicos, mas pouca informação sobre a produção de biomassa fúngica e seus metabólitos são encontrados na literatura. Por causa disto, uma técnica não-destrutível foi desenvolvida a fim de avaliar a produção de biomassa e a análise de metabólitos tais como pigmentos, enzimas, açúcares, ácidos orgânicos presentes no meio agar.

Baar *et al.* (7) determinaram a biomassa fúngica dissolvendo o meio agar em água quente e filtrando as soluções antes de secá-las à 100°C por 24 h e determinando o peso seco de acordo com Oort (8). Como discutido por Jongbloed &

Borst-Pauwels (9), este método pode causar perda dos componentes solúveis na água. A perda de peso fúngico seco de *L. bicolor* foi estimado por Jongbloed & Borst-Pauwels (9) de aproximadamente 19%.

Gibson & Deacon (10) descreveram o desenvolvimento micelial de fungos ectomicorrízicos *in vitro* pelo crescimento radial e biomassa produzida. Jongbloed & Borst-Pauwels (8) fizeram uma hipótese que o crescimento radial reflete na verdade a exploração dos recursos presentes, sendo por outro lado, a biomassa produzida uma medida do acúmulo de carbono e de nutrientes.

O objetivo deste trabalho é apresentar algumas modificações na técnica empregada por Baar *et al.* (7) e analisada por Jongbloed and Borst-Pauwels (8) a fim de poder quantificar a concentração de glucose, o pH e a biomassa produzida após 5, 10 e 15 dias de incubação à 25°C para as linhagens de *Suillus collinitus* e *Pisolithus tinctorius* sobre diferentes meios de cultura (PDA, BAF, MNM, MP, GM8, MG). Esta técnica não destrutível está sendo utilizada agora para avaliar a produção de biomassa e analisar os metabólitos tais como os pigmentos, as enzimas e ácidos orgânicos presentes no agar e/ou na biomassa.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Linhagem

Micélio das espécies ectomicorrízicas foram obtidos dos corpos frutíferos nas florestas de *Pinus. Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch (PF 26) foi isolado na região de Murcia (Espanha) em 1991 e *Suillus collinitus* Fr. (Sc 24) na região da La Grande-Motte (sudoeste da França) em 1994.

### Meios de cultura

O micélio das linhagens foi cultivado e mantido no meio PDA. A composição dos meios de cultura utilizados é dada a seguir.

Meios de cultura (g/l) 1) Meio PDA: 39,0 (pH 5,6). 2) Meio BAF: glucose, 30,0; peptona, 2,0; extrato de levedura, 0,2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5; citrato férrico (1%), 0,5 ml; myo inositol, 5 ml; Solução de oligoelementos\*,

1,0 ml; Solução de vitaminas\*\*, 1,0 ml; agar, 15,0 (pH= 6,0). 3) Meio MG: glucose, 10,0; agar, 15,0 (pH=6,5). 4) Meio MP: glucose, 10,0; peptona, 2,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5;  $\text{CaCl}_2$ , 0,1;  $\text{FeCl}_3$ , 0,01; Solução de vitaminas\*\*, 1,0 ml; agar, 15,0 (pH=7,5) 5) Meio GM8: glucose, 31,25; peptona, 2,5; nitrato de cálcio, 2,0; asparagina, 1,0; tartrato de amônia, 1,0; agar, 15,0 (pH=5,0). 6) Meio MNM: glucose; 10,0; peptone, 2,0; extrato de malte, 3,0;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5;  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,15;  $\text{FeCl}_3$ , 0,01; Thiamine HCl, 100- $\mu\text{g}$ ; Oligoelement solution\*, 1,0 ml; agar, 15,0 (pH=5,0).

\* Solução de oligoelementos (g/l):  $\text{CaCl}_2$ , 100,0;  $\text{MnSO}_4$ , 5,0;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.

\*\* Solução de vitaminas (mg/l): Tiamina HCl, 500; Biotina, 10; Ácido Fólico, 100.

### Inoculação e Incubação

Um disco de papel celofane, previamente estéril, é depositado sobre o meio de cultura nas placas de Petri de 60 mm de diâmetro. Foram inoculadas centralmente com um bloco de micélio de aproximadamente (3 x 3 x 2 mm) tomado da extremidade de uma colônia de 15 dias de idade sobre o meio PDA.

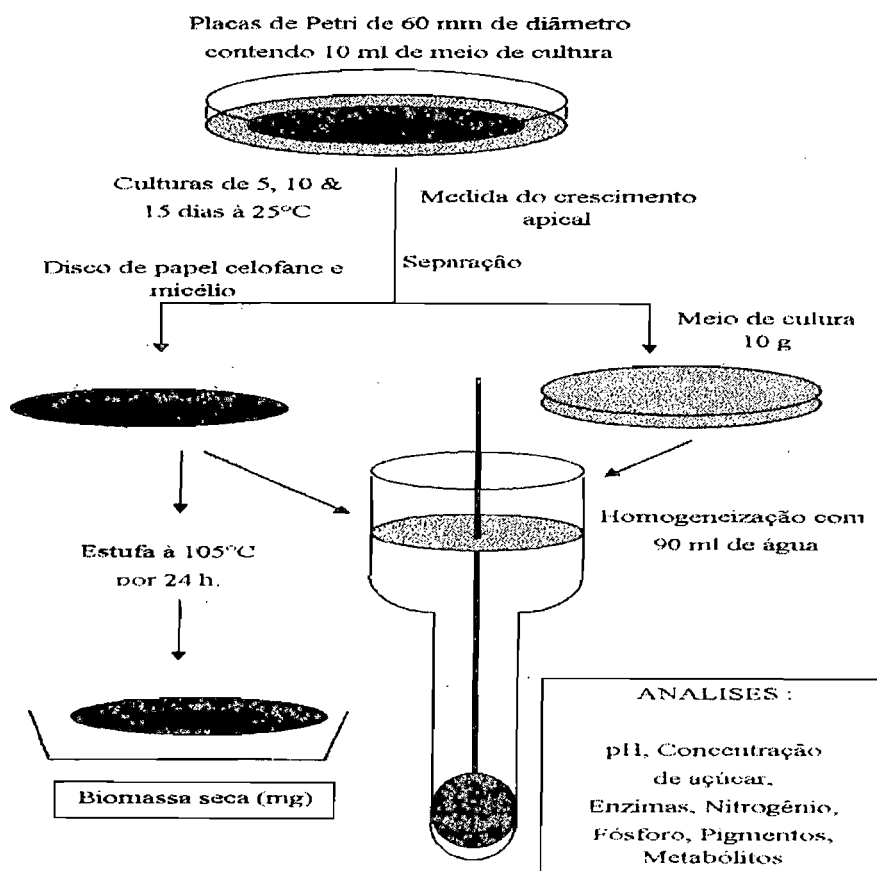
As placas de Petri foram vedadas com "Parafilm". As culturas foram conduzidas à 25°C na obscuridade.

### Análise

O diâmetro da colônia foi medido com uma régua a intervalos de tempo regulares, até 15 dias. Os resultados são expressos como uma média de 3 triplicadas.

O tratamento das amostras é efetuado segundo o esquema da Fig. 1. A colônia que cresceu sobre o papel celofane é separada e seu peso é determinado. Todo o meio agar (10 g) é ressuspenso em 90 ml de água destilada e homogeneizado durante 30 segundos no Potter à 4 °C.

A biomassa (peso seco) é determinada colocando-se o disco de celofane contendo o micélio a secar à 105 °C por 24 horas. O peso do disco de celofane foi determinado como uma média de 15 amostras. O açúcar consumido foi determinado pelo método de Miller (11).



**Figura 1.** Esquema da cultura de fungo sobre papel celofane e tratamento das amostras para determinação da biomassa produzida e análise dos metabólitos produzidos durante o crescimento em superfície sólida.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Tabelas 2 e 3 são apresentados os valores de consumo de açúcar, biomassa produzida, diâmetro da colônia e pH das linhagens de *Suillus collinitus* e *Pisolithus tinctorius*.

### Comparação do crescimento de *S. collinitus* entre diferentes meios de cultura

A Figura 2 mostra diferentes meios de cultura que foram testados para a escolha de um meio de cultura favorável a produção de biomassa e consumo de glicose. Pode-se afirmar que para a linhagem de *Suillus collinitus* (Sc 24), o meio PDA é o melhor meio de cultura testado. Após 15 dias de cultura, o consumo de açúcar foi de 96%

(Tabela 2) e uma boa quantidade de biomassa foi produzida (7,1 g/l). Esta linhagem utiliza a glicose e os oligoelementos e minerais do meio PDA. O meio BAF, que é um meio sintético, é favorável à produção de biomassa e isto sugere que extrato de levedura, oligoelementos e vitaminas favorecem o crescimento de Sc 24. Por outro lado, o meio MNM, que é um meio inteiramente sintético, mostra que para Sc 24, as vitaminas não favorecem o crescimento e que a diminuição do pH após 15 dias de incubação é devido a presença de íons  $PO_4^{3-}$  na sua composição. Neste meio, o consumo de açúcar é de 93 % e a fonte de nitrogênio é o fator limitante neste meio.

**Tabela 2:** Evolução do pH, produção de biomassa e consumo de glicose após 15 dias de incubação à 25°C para a linhagem de *Suillus collinitus*.

Meios de cultura	Consumo de glicose (%)	Biomassa produzida (g/l)	Diâmetro da colônia (mm)	pH
PDA	96	7,1	45	5,0
BAF	69	8,6	50	4,2
MNM	93	3,9	45	3,5
MP	27	1,3	24	5,8
GM8	0	1,6	18	4,8
MG	42	1,6	32	4,9

O meio GM8 contém como fonte de nitrogênio uma mistura de nitrato, asparagina, peptona e amônia. Mas, neste meio, ambas as linhagens não utilizam a glicose e pouca biomassa é obtida. Então, pode-se concluir que o nitrato à uma concentração de 2 g/l tem um efeito negativo para ambas as linhagens como observado anteriormente por De Araújo et al. (6).

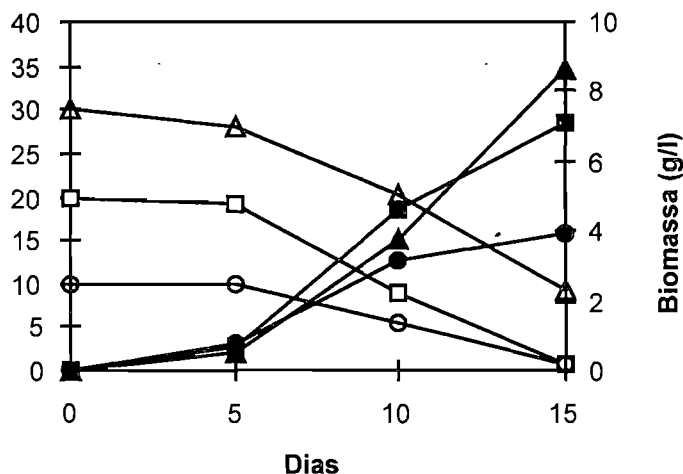
O meio MG contém somente glicose e agar na sua composição. Observou-se que o micélio apresenta um aspecto aéreo devido a composição pobre deste meio de cultura. O consumo de glicose é de 42 %, mas muito pouca biomassa é produzida. Pode-se supor que o fungo utiliza uma pequena quantidade de nitrogênio presente no inóculo (proveniente do inóculo de PDA) e pode-se afirmar que neste meio MG, obteve-se apenas o alongamento das hifas do micélio com um desenvolvimento pobre devido a não presença de nitrogênio no meio de cultura e os fungos ectomicorrízeos não são microorganismos fixadores de nitrogênio de acordo com Pelmont (1). O meio MP contém glicose, peptona, mas não contém extrato de levedura, sais de sulfato e solução de oligoelementos. Apenas 31 % do açúcar é consumido neste meio de cultura e muito pouca biomassa é produzida. O meio GM8, que não é um meio sintético, pois contém peptona, apresenta nitrato na sua composição o qual é tóxico e não é utilizado como fonte de nitrogênio para o crescimento de *Sc 24*.

Permaneceremos com o meio PDA para os futuros experimentos. Esta escolha foi a mesma feita por Torres and Honrubia (12) que estudaram a influência do meio de cultura e do pH no crescimento de linhagens de fungos ectomicorrízeos isolados na região de Murcia e Albacete (Espanha), tais como: *Suillus collinitus*, *Suillus granulatus*, *Rhizopogon rosellus*, *Rhizopogon luteolus* e *Amanita muscaria*. Eles cultivaram as linhagens em diferentes meios de cultura tais como: MMN, PDA, MEA 2% e Hagem, e variaram o pH entre 5,5 e 7,5. Para *S. collinitus*, após 60 dias de cultura à 24°C, encontraram que o meio PDA foi o melhor meio de cultura tendo a colônia apresentado um diâmetro de 8,5 cm

#### Comparação do crescimento de *P. tinctorius* entre diferentes meios de cultura

De acordo com a Fig. 3 e Tabela 3, um melhor desenvolvimento do micélio é observado sobre o meio PDA, BAF e MNM. Esta linhagem (PF 26) não utiliza a glicose nas mesmas proporções que *Sc 24*; após 15 dias de incubação no meio PDA, 48% da glicose ainda está presente e para o meio BAF, 59% está presente. Pode-se dizer que este consumo de glicose menor para a linhagem de PF 26 é devido, principalmente, ao crescimento deste fungo que é mais lento que ao *Sc 24*. Por outro lado, o BAF é um bom meio de cultura, apresentando uma produção de biomassa de 7,6 g/l. Talvez, a fonte de nitrogênio é o fator limitante para este fungo neste meio. Parece que a linhagem de PF 26, contrariamente a *Sc 24*, tolera a presença de nitrato; isto podendo explicar uma biomassa produzida de 2,7 g/l no meio GM8.

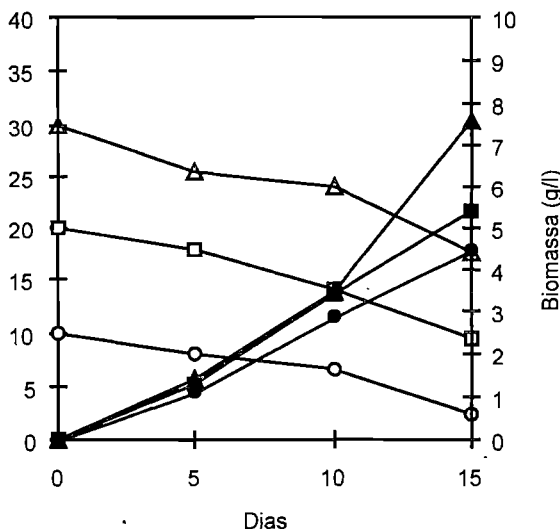
**Figura 2.** Consumo de açúcar (símbolos vazios) e produção de biomassa (símbolos cheios) para *Suillus collinitus* cultivado durante 15 dias à 25°C. Meios de cultura: PDA (■); BAF (△); MNM (○).



**Tabela 3:** Evolução do pH, produção de biomassa e consumo de glicose após 15 dias de incubação à 25°C para a linhagem de *Pisolithus tinctorius*.

Meios de cultura	Consumo de glicose (%)	Biomassa produzida (g/l)	Diâmetro da colônia (mm)	pH
PDA	52	5,4	23	5,8
BAF	41	7,6	37	4,3
MNM	77	4,5	43	3,4
MP	31	0,9	16	6,6
GM8	0	2,7	20	6,0
MG	24	1,4	33	5,7

**Figure 3.** Consumo de açúcar (símbolos vazios) e produção de biomassa (símbolos cheios) para *Pisolithus tinctorius* cultivado em diferentes meios de cultura durante 15 dias à 25°C. Meios de cultura: PDA (■); AF (△); MNM (○).



## CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que esta técnica para o crescimento de fungos, análise dos parâmetros tais como pH, consumo de açúcar no meio agar está bem estabelecida. Os valores obtidos de biomassa produzida, consumo de açúcar e pH permitem otimizar as condições de cultura e estudar a fisiologia e o metabolismo de fungos micorrízicos sobre meios de cultura com agar. A grande vantagem desta técnica está baseada no fato que é um método de tratamento das amostras não destrutível, em outras palavras, utilizando-se o homogeneizador e trabalhando à baixas temperaturas, (4°C), todas as enzimas e metabólitos produzidos podem ser detectados e quantificados.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Drs. D. Mousain e C. Plassard (Institut National de Recherche Agronomique, Montpellier, França) por fornecerem as linhagens de fungos ectomicorrízicos. Álvaro A. De Araújo agradece ao Governo Brasileiro (CNPq) por sua bolsa de estudos que foi gerada por SFERE - França (Société Française d'Exportation des Ressources Educatives). Esta pesquisa foi financiada pela Comunidade Européia, programa MYCOMED n°AIR2 - CT 94-1149 e IRD, Dept. DRV..

## REFERENCIAS

1. Pelmont, J. (1993), *Bacteries et environnement*. 1st ed., Presses Universitaires de Grenoble, Grenoble.
2. Mousain, D. (1993), *Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides*. 1st ed., Editions John Libbey, Eurotext, Montrouge. CEE Project "MYCOMED", Contract Number AIR 2-CT-94-1149, Final Progress Report.
3. Strullu, D. G. (1991), *Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées*, 3rd ed., Lavoisier. Paris.
4. Marx, D.H. and Cordell, C.E. (1994), In: J.M. Whipps & R.D. Lumsden (Eds). *Biotechnology of fungi for improving plant growth*. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, 1-25.
5. Mousain, D., Plassard, C., Roussos, S., Brunel, B., Karkouri, K. E., Fréchet, C.C., Laguette, A.G., Bouckcim, H., Gobert, A., De Araujo, A.A. (1998) *Improvement of the quality of forest seedlings Pinus pinea, Pinus halepensis, Pinus nigra subsp. laricia, Quercus suber) and MEDiterranean reforestation using controlled MYCorrhizal infection (MYCOMED)*. Final Progress Report CEE Contrat n° AIR 2-CT-94-1149.
6. De Araujo, A.A., Hannibal, L., Plassard, M., Mousain, D. and Roussos, S., (1998), *Micol. Neotrop. Apl.* **11**, 23-34.
7. Baar, J., Comini, B., Elferink, M.O., and Kuyper, Th. W. (1997) *Mycol. Res.* **101** (5), 523-529.
8. Oort, A. J. P. (1981), *Verhandelingen. Koninklijke Nederlandse akademie van Wetenschappen, Afdeling Natuurwetenschappen*, 2nd. **76**, 1-87
9. Jongbloed, R.H. and Borst-Pauwels, G.W.F.H. (1990), *Acta Bot. Neerl.* **39**, 349-358.
10. Gibson, F. and Deacon, J.W. (1990), *Mycol. Res.* **94** (2), 166-172.
11. Miller, G.L. (1959), *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
12. Torres, P. and Honrubia, M. (1991), *Cryptogamie Mycol.* **12** (3), 183-192.

De Araujo A.A., Roussos Sevastianos. (2000).

Estudos fisiologicos e producao de fungos micorrizeos.

In : Riede C.R. (ed.), Sera T. (ed.), Soccol C.R. (ed.).

Anais do 3 Seminario internacional sobre biotecnologia na agroindustria cafeeira = Proceedings of the 3rd international seminar on biotechnology in the coffee agroindustry.

Londrina, PR (BRA) ; Montpellier : IAPAR ; IRD, p. 293-298.

SIBAC : International Seminar, 3., Londrina, PR (BRA), 1999/05/24-28.