

MANGANÊS E GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES *IN VITRO*⁽¹⁾

E. J. B. N. CARDOSO⁽²⁾, R. B. NAVARRO⁽³⁾ & M. A. NOGUEIRA⁽⁴⁾

RESUMO

A alta disponibilidade de íons metálicos no solo, dentre eles o Mn^{2+} , pode inibir os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), retardando a germinação dos esporos e, conseqüentemente, a formação de micorriza, o que reduz a eficiência simbiótica. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do íon Mn^{2+} sobre a germinação de esporos de seis espécies de FMA dos gêneros *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora* e *Scutellospora* em experimento *in vitro*. Em substrato constituído por areia lavada, adicionaram-se 15; 30 e 75 mg kg⁻¹ de Mn^{2+} , na forma de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, mantendo-se um controle sem adição de Mn. Acondicionaram-se os esporos em envelopes membranosos, introduzindo-os entre duas camadas de areia com diferentes níveis de Mn, em placas de Petri. Após 30 dias de incubação, avaliou-se a germinação dos esporos. Houve decréscimo médio de 32, 49 e 75 % na germinação dos esporos, à medida que se aumentaram as doses de Mn, em comparação ao controle. A germinação de esporos do gênero *Glomus* foi totalmente inibida na maior dose. O gênero *Acaulospora* sofreu decréscimos de até 50 % já na dose de 15 mg kg⁻¹ de Mn^{2+} , enquanto os gêneros *Scutellospora* e *Gigaspora* apresentaram os maiores índices de germinação de esporos, tendo havido tolerância no caso de *Gigaspora*, mesmo na maior dose de Mn^{2+} , e estímulo à germinação no caso de *Scutellospora* até à dose 30 mg kg⁻¹ de Mn^{2+} .

Termos de indexação: fungistase, metal pesado, *Glomales*.

⁽¹⁾ Recebido para publicação em setembro de 2001 e aprovado em março de 2002.

⁽²⁾ Professora Titular do Departamento de Solos e Nutrição de Plantas da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ/USP. Caixa Postal 09, CEP 13418-900 Piracicaba (SP). Bolsista do CNPq. E-mail: ejbncard@esalq.usp.br

⁽³⁾ Mestre em Microbiologia Agrícola, ESALQ/USP. E-mail: rasangelanavarro@hotmail.com

⁽⁴⁾ Doutorando em Solos e Nutrição de Plantas, ESALQ/USP. Bolsista da FAPESP. E-mail: nogueira@esalq.usp.br

SUMMARY: MANGANESE AND SPORE GERMINATION OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI IN VITRO

*The high availability of metallic ions in the soil, including Mn^{2+} , may inhibit arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), slowing down spore germination and, consequently, the mycorrhiza formation, therefore decreasing the symbiotic effectiveness. The aim of this study was to evaluate the effect of Mn^{2+} ions on spore germination in six AMF species of the genera *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora* and *Scutellospora* under in vitro conditions. Different Mn^{2+} doses (15, 30 and 75 mg kg^{-1}) as $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ were added to a washed sand substrate, keeping a control without Mn addition. Spores were accommodated in membranous envelopes which were placed between two sand layers treated with the above Mn doses in Petri dishes. After a 30 day incubation period, spore germination was evaluated, presenting decreases (32, 49 and 75 %) as Mn doses increased, compared to the control. Spore germination in the genus *Glomus* was completely inhibited at the top dose, while in the *Acaulospora* genus it dropped down to 50 % even at the lowest dose (15 mg kg^{-1} of Mn^{2+}). The genera *Scutellospora* and *Gigaspora* presented highest germination indexes, out of which *Gigaspora* presented Mn tolerance, even at the highest Mn^{2+} dose. *Scutellospora* presented stimulus for germination up to doses of 30 mg kg^{-1} of Mn^{2+} .*

Index terms: fungistasis, heavy metal, Glomales.

INTRODUÇÃO

A avaliação da compatibilidade das interações entre hospedeiro, ambiente e fungos micorrízicos arbusculares (FMA) geralmente é feita pela determinação do número de esporos no solo, pela capacidade de germinação dos esporos e pela colonização radicular interna (Clark, 1997). Os FMA são encontrados nos mais variados ambientes, em solos com pH variando de 2,7 a 9,2 (Daft & El-Giahmi, 1975; Bowen, 1980). Entretanto, o efeito de baixos valores de pH do solo sobre os FMA é difícil de ser avaliado isoladamente, uma vez que este fator aumenta a disponibilidade de vários elementos, como os íons metálicos Al, Cu, Fe, Mn e Zn (Lambais & Cardoso, 1988). Esses íons, por sua vez, influenciam tanto os FMA quanto seus hospedeiros.

A germinação dos esporos e o desenvolvimento inicial das hifas fúngicas podem ser diminuídos ou inibidos pela presença excessiva de metais, o que pode atrasar ou suprimir a formação de micorriza (Koomen et al., 1990). Os efeitos tóxicos do Mn ocorrem normalmente em combinação com os do Al em solos com pH inferior a 5,5, cujos materiais de origem são ricos em Mn. Entretanto, em solos com pH superior a 5,5, o alumínio é precipitado quase que completamente, ao passo que o Mn ainda está disponível (Foy, 1984), podendo causar efeitos adversos, se em excesso.

Os diferentes ecotipos de FMA podem apresentar diferentes graus de tolerância a metais: os isolados de locais com alta contaminação, ou com níveis naturalmente altos, como o caso do Mn e Al em

muitos solos brasileiros, tendem a ser mais tolerantes na mesma situação (Weissenhorn et al., 1993; 1994). Weissenhorn et al. (1994) observaram que a germinação dos esporos de FMA isolados de locais contaminados por Zn e Cd foi menos inibida por esses elementos em comparação ao observado para esporos provenientes de locais não contaminados. Outra constatação foi que o índice de tolerância ao metal não foi específico, ou seja, esporos provenientes de campos contaminados com Cd também foram mais tolerantes a Zn, e vice-versa.

Os mecanismos de adaptação dos FMA a altas concentrações de metais não são conhecidos. Entretanto, considerando o seu ciclo relativamente longo e o grande número de núcleos em seus esporos, essa maior tolerância a metais pode estar relacionada com a plasticidade fenotípica e não com a seleção de genótipos tolerantes (Weissenhorn et al., 1994).

A maioria dos trabalhos na literatura relata os efeitos fungistáticos de íons metálicos como o Al, Cd, Zn e Cu, mas não o Mn, sobre esporos de FMA. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do Mn solúvel na germinação *in vitro* de esporos de seis espécies de FMA.

MATERIAL E MÉTODOS

O substrato utilizado para avaliar a germinação dos esporos de FMA foi constituído por areia (< 2 mm) tratada por 24 h com HCl a 5 %. Após esse tratamento, o substrato foi lavado com água até à

retirada do ácido, conforme constatado pela medição dos valores de pH após cada lavagem. Considerou-se que o ácido havia sido removido quando foram obtidos valores de pH em torno de 5. A areia lavada foi submetida à autoclavagem a 121 °C, por 2 h, e, em seguida, analisada quanto à sua composição química para fins de fertilidade, revelando os seguintes resultados: pH (CaCl₂) = 5; P (resina) = 4,8 mg dm⁻³; Ca = 1,5 mmol_c dm⁻³; H + Al = 1,6 mmol_c dm⁻³; Cu = 0,07; Fe = 0,6; Mn = 0,3 e Zn = 0,6 mg dm⁻³.

As espécies de fungos micorrízicos empregadas neste estudo foram obtidas da micoteca da Seção de Microbiologia do Solo do Departamento de Solos e Nutrição de Plantas da ESALQ, provenientes de vasos de multiplicação com milho, sendo elas: *Acaulospora appendicula* Spain (Sieverding & Schenck), *Acaulospora morrowae* (Spain & Schenck), *Scutellospora heterogama* Nicol. & Gerd. (Walker & Sanders), *Gigaspora margarita* (Becker & Hall), *Glomus macrocarpum* (Tul & Tul. var. *macrocarpum*) e *Glomus etunicatum* (Becker & Gerdemann). Os esporos foram extraídos por peneiramento úmido (Gerdemann & Nicolson, 1963) de uma alíquota do substrato e retidos em peneiras de malha variando de 50 a 250 µm, dependendo da espécie, após centrifugação em solução de sacarose a 40 % (p/v), por 4 minutos, e lavados em água estéril. Para a remoção de fragmentos de hifas e outras impurezas, os esporos foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 mL que continham 50 g de sílica (> 1 e < 2 mm) em 50 mL de água e agitados, durante 30 min, a 60 rpm. Para a recuperação dos esporos, repetiu-se o procedimento de peneiramento úmido após centrifugação em solução de sacarose.

Para eliminar ao máximo a influência de outros fatores biológicos no estudo, os esporos foram desinfestados à superfície com solução de hipoclorito de sódio a 0,3 % (v/v), por três minutos, com posterior lavagem em água destilada.

As doses de Mn foram adicionadas à areia lavada, na forma de MnCl₂.4H₂O em solução, com vistas em obter 15, 30 e 75 mg kg⁻¹ de Mn, além de um controle sem adição de Mn. Cada tratamento, em três repetições, foi acondicionado em placas de Petri com capacidade para 100 g do substrato. Com o auxílio de um microscópio estereoscópio, os esporos de cada espécie foram transferidos em grupos de 20 para membranas de filtragem, marca Sartorius, de 47 mm de diâmetro, quadriculadas (3 x 3 mm) e 3 µm de porosidade. As membranas foram dobradas na forma de envelope e introduzidas entre duas camadas de areia tratada com as doses de Mn. A umidade da areia foi mantida em torno de 80 % da capacidade máxima de retenção de água, pela adição de 20 mL da solução nutritiva de Steinberg (Foy et al., 1967), com 1/3 da concentração de P, tamponada a pH 5 e isenta de Mn. As placas foram embrulhadas em papel alumínio e incubadas, por 30 dias, em estufa biológica com temperatura controlada a 30 °C. Após esse período, os envelopes foram removidos e

submetidos à avaliação da germinação dos esporos sob microscópio estereoscópio, no aumento de 45 a 90 vezes. Foram considerados germinados os esporos que apresentaram emergência do tubo germinativo.

Os resultados obtidos, em porcentagem, foram submetidos à análise de variância com aplicação do teste F, em esquema fatorial 4 x 6, com prévia transformação dos dados para arcsen ($x/100$)^{1/2}, em que x é a porcentagem de germinação. Constatada a interação entre os fatores doses de Mn e fungos micorrízicos, aplicou-se o teste de Tukey (P < 0,05), para comparar os fungos micorrízicos em cada dose de Mn, bem como a análise de regressão, para avaliar o efeito das doses de Mn em cada espécie de fungo micorrízico. A variação percentual média da germinação dos esporos nas diferentes doses de Mn, em relação ao tratamento sem Mn, foi calculada segundo Lambais & Cardoso (1989).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado da análise estatística revelou interação entre os fatores avaliados a P < 0,01, ou seja, o efeito das doses de Mn foi diferenciado para cada espécie de fungo micorrízico em estudo. Cada espécie de FMA apresentou maior ou menor sensibilidade à adição de Mn (Figuras 1 e 2). Uma delas, *S. heterogama*, teve sua germinação estimulada, até certo limite, pela adição de Mn. As demais espécies apresentaram inibição da germinação dos esporos com o aumento da disponibilidade de Mn (Figura 1).

As espécies do gênero *Glomus* foram totalmente inibidas na maior dose de Mn. *G. etunicatum* foi a espécie que apresentou os menores índices de germinação, cerca de 20 %, mesmo no tratamento sem adição de Mn (Figura 2). Essa observação pode refletir a falta de adaptação dessa espécie ao substrato utilizado, o qual, quando acrescido de Mn, limitou ainda mais a germinação dos esporos. *G. margarita* foi a espécie que apresentou o maior índice de germinação dos esporos e a que menos sofreu a interferência negativa da adição do Mn. Lambais & Cardoso (1989) relataram que doses crescentes de Al até 130 µmol L⁻¹ não diminuíram significativamente a germinação dos esporos dessa espécie, em experimento semelhante. Alta resistência de *G. margarita* a metais também foi observada por Siqueira et al. (1985). Entretanto, Bartolome-Esteban & Schenck (1994) também observaram baixa sensibilidade de *G. margarita* em solos com crescentes saturações por Al. Por outro lado, *Acaulospora appendicula* foi a espécie que apresentou um dos maiores índices de germinação dos esporos no tratamento sem Mn (Figura 1), mas foi a que apresentou a maior inibição com a adição de Mn, de forma semelhante ao tratamento com *G. etunicatum* (Figuras 1 e 2).

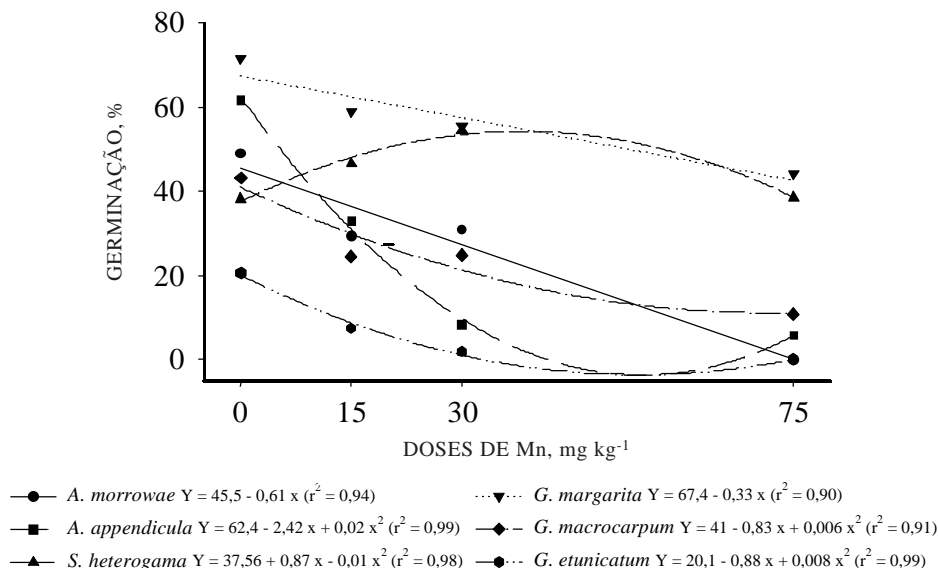


Figura 1. Germinação de esporos de seis espécies de fungos micorrízicos arbusculares, de acordo com doses de Mn adicionadas ao substrato. Barras verticais indicam DMS em cada dose de Mn; coeficientes das equações são significativos a P < 0,05.

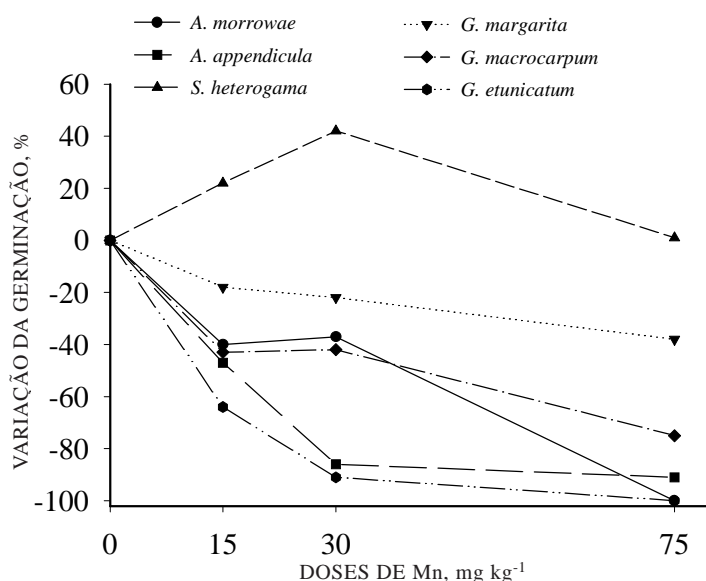


Figura 2. Variação percentual da germinação dos esporos de fungos micorrízicos arbusculares de acordo com doses de Mn adicionadas ao substrato, em relação ao tratamento sem adição de Mn.

Considerando o efeito do Mn, houve diminuição da germinação relativa dos esporos com o aumento das doses de Mn no meio de cultivo, com perdas do potencial germinativo médio de 32, 49 e 74 %, nas doses de 15, 30 e 75 mg kg⁻¹ de Mn²⁺, respectivamente, em comparação com o controle sem sua adição, considerado como 0 % (Figura 2).

Deve-se considerar, entretanto, que a espécie *S. heterogama*, de modo contrário ao que ocorreu com as demais espécies, teve sua germinação estimulada

com o aumento das doses de Mn até 30 mg kg⁻¹ (Figura 2), com variação 40 % superior à do controle sem adição de Mn. Na dose de 75 mg kg⁻¹ de Mn, não houve estímulo nem inibição da germinação dos esporos dessa espécie em comparação ao controle sem Mn. Tanto *S. heterogama* quanto *G. margarita* são citadas por Green et al. (1976) como espécies amplamente disseminadas em solos ácidos, situação que favorece a disponibilidade de íons metálicos, como o Mn. O fato de *G. margarita* ter apresentado

os menores decréscimos na germinação dos seus esporos com o aumento da disponibilidade de Mn, além do estímulo no caso de *S. heterogama*, poderia estar relacionado com a prévia adaptação dessas espécies a ambientes com alta disponibilidade de Mn ou mesmo Al, já que a tolerância a metais por FMA parece não ser específica (Weissenhorn et al., 1994).

Por outro lado, as espécies do gênero *Glomus* são relatadas como altamente susceptíveis a íons metálicos (Siqueira et al., 1984; Bartolome-Esteban & Schenck, 1994), e, juntamente com as do gênero *Acaulospora*, foram as que mais sofreram os efeitos negativos da adição de Mn (Figura 2).

Lambais & Cardoso (1989) observaram, em condições semelhantes, alta inibição da germinação de esporos de *G. macrocarpum* em resposta ao aumento da disponibilidade de Al, corroborando os resultados obtidos por Siqueira et al. (1985), que constataram efeito inibitório ao *G. mosseae* em concentração de 1,5 mg kg⁻¹ de Al, enquanto, para *G. margarita*, esse efeito somente ocorreu em concentrações superiores a 30 mg kg⁻¹.

O conhecimento do comportamento de cada espécie ou isolado de FMA quanto à exposição ao Mn poderá ser utilizado para nortear trabalhos que pretendam utilizar essas espécies em ambiente com alta disponibilidade desse elemento, como nos casos de experimentos em que se faz necessária a autoclavagem do solo, procedimento que, dependendo do solo, leva a grande aumento da disponibilidade de Mn. Isso não significa que as espécies menos susceptíveis à alta disponibilidade de Mn em estudos *in vitro* também sejam eficientes no estabelecimento da simbiose e na promoção de efeitos positivos em seus hospedeiros (Lambais & Cardoso, 1988), sendo necessários estudos, em cada situação, com vistas em obter essas informações.

CONCLUSÕES

1. A germinação de esporos de fungos micorrízicos arbusculares mostrou-se diferencialmente prejudicada entre espécies e doses de Mn²⁺.

2. A germinação de esporos de *S. heterogama* foi estimulada por doses intermediárias de Mn²⁺ e não foi influenciada na dose de 75 mg kg⁻¹, em relação ao controle sem adição de Mn²⁺.

3. As espécies dos gêneros *Glomus* e *Acaulospora* mostraram-se mais sensíveis à presença de doses de Mn²⁺ em relação ao gênero *Gigaspora*.

LITERATURA CITADA

BARTOLOME-ESTEBAN, H. & SCHENCK, N.C. Spore germination and hyphal growth of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil aluminum saturation. *Mycologia*, 86:217-226, 1994.

BOWEN, G.D. Mycorrhizal roles in tropical plants and ecosystems. In: MIKOLA, P., ed. *Tropical mycorrhiza research*. Oxford, Oxford University Press, 1980. p.165-190.

CLARK, R.B. Arbuscular mycorrhizal adaptation, spore germination, root colonization, and host plant growth and mineral acquisition at low pH. *Plant Soil*, 192:15-22, 1997.

DAFT, M.J. & EL-GIAHMI, A.A. Effects of *Glomus* infections on three legumes. In: SANDERS, F.E.; MOSSE, B. & TINKER, P.B., eds. *Endomycorrhizas*. London, Academic Press, 1975. p.470-484.

FOY, C.D. Physiological effects of hydrogen, aluminum and manganese toxicities in acid soil. In: ADAMS, F., ed. *Soil acidity and liming*. Madison, American Society of Agronomy, 1984. p.57-97.

FOY, C.D.; FLEMING, A.L; BURNS, G.R. & ARMIGER, W.H. Characterization of differential aluminum among varieties of wheat and barley. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 31:513-521, 1967.

GERDEMANN, J.N. & NICHOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 46:235-244, 1963.

GREEN, N.E.; GRAHAM, S.O. & SCHENCK, N.C. The influence of pH on the germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal spores. *Mycologia*, 68:929-934, 1976.

KOOMEN, I.; McGRATH, S.P. & GILLER, I. Mycorrhizal infection of clover is delayed in soils contaminated with heavy metals from past sewage sludge applications. *Soil Biol. Biochem.*, 22:871-873, 1990.

LAMBAIS, M.R. & CARDOSO, E.J.B.N. Avaliação da germinação de esporos de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares e da colonização micorrízica de *Stylosanthes guianensis* em solo ácido e distrófico. *R. Bras. Ci. Solo*, 12:249-255, 1988.

LAMBAIS, M.R. & CARDOSO, E.J.B.N. Germinação de esporos e crescimento do tubo germinativo de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em diferentes concentrações de alumínio. *R. Bras. Ci. Solo*, 13:151-154, 1989.

SIQUEIRA, J.O.; HUBBELL, D.H. & MAHMUD, A.W. Effect of liming on spore germination, germ tube growth and root colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil*, 76:115-124, 1984.

SIQUEIRA, J.O.; SYLVIA, D.M.; GIBSON, J. & HUBBELL, D.H. Spores germination and germ tube growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Can. J. Bot.*, 31:965-972, 1985.

WEISSENHORN, I.; GLASHOFF, A.; LEYVAL, C. & BERTHELIN, J. Differential tolerance to Cd and Zn of arbuscular mycorrhizal (AM) fungal spores isolated from heavy metal-polluted and unpolluted soils. *Plant Soil*, 167:189-196, 1994.

WEISSENHORN, I.; LEYVAL, C. & BERTHELIN, J. Cd-tolerant arbuscular mycorrhizal (AM) fungi from heavy-metal polluted soils. *Plant Soil*, 157:247-256, 1993.

