

MÍRIAN JOSEFINA BAPTISTA

EFEITO DE FLAVONÓIDES NA GERMINAÇÃO E NO CRES-
CIMENTO ASSIMBIÓTICO DE FUNGOS MICORRÍZICOS
VESICULO-ARBUSCULARES

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agri-
cultura de Lavras, como parte das exigências do Cur-
so de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Con-
centração Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção
do grau de MESTRE.



ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS
LAVRAS - MINAS GERAIS

1993

DEPARTAMENTO
INSTITUTO
BRASILEIRO DE PESQUISA
AGROPECUÁRIA

MIRIAM JOSEFINA BAPTISTA

ESTUDO DE FLAVONÓIDES NA GERMINAÇÃO E NO CRESCIMENTO ASSIMBIÓTICO DE FUNGOS MICORRIZIAIS VESICULO-ARBUSCULARES

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração em Pós-Graduação em Agronomia, Curso de Mestrado em Agronomia, sob a orientação do Prof. Dr. Paulo Roberto de Souza de Mestrado.

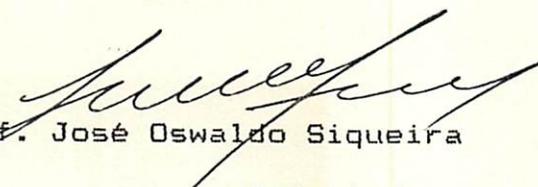


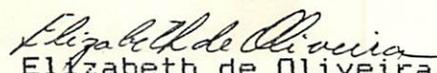
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
LAVRAS - MINAS GERAIS

1983

EFEITOS DE FLAVONOIDES NA GERMINAÇÃO E NO CRESCIMENTO
ASSIMBIOTICO DE FUNGOS MICORRIZICOS VESICULO-ARBUSCULARES

APROVADA:


Prof. José Oswaldo Siqueira
Orientador


Pesq. Elizabeth de Oliveira


Prof. Fátima Maria S. Moreira

A minha mae Maria da Conceição

HOMENAGEM

A todos que, com companheirismo e
amizade, indiretamente ajudaram a
conduzir este trabalho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Escola Superior de Agricultura de Lavras e ao Departamento de Ciência do Solo, pela oportunidade de aprendizagem.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudo concedida.

Ao professor José Oswaldo Siqueira pelas sugestões e orientação na realização desse trabalho.

A pesquisadora Elizabeth de Oliveira pelas sugestões, amizade e apoio.

A funcionaria Ana Maria Alvarenga pela atenção e auxílio.

Ao laboratorista Manoel Aparecido da Silva e aos colegas José Pereira da Silva Junior e Orivaldo S. Junior pela amizade, companheirismo e apoio.

Aos estagiários do Laboratório de Microbiologia do Solo pela amizade.

A Hilton J. Estanislão pelo apoio e carinho sempre presentes.

Aos colegas Aloyseia Cristina, Claudia Marinho, Deborah Guerra, João Alencar, Luiz T. Soria e Rafael Ulisses pela ótima convivência e apoio.

BIOGRAFIA DA AUTORA

MIRIAN JOSEFINA BAPTISTA, filha de José Silvério Baptista e Maria da Conceição Mendes, natural de Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, nascida aos 19 de outubro de 1967.

Em março de 1985 iniciou o curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Minas Gerais, graduando-se em Licenciatura em novembro de 1989 e Bacharelado em julho de 1990.

Em março de 1991 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 setembro de 1993.

SUMARIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Compostos fenólicos no sistema solo-planta	3
2.2 Atividade de compostos fenólicos em sistemas parasíticos	6
2.3 Compostos fenólicos na simbiose rizóbio-leguminosas .	9
2.4 Compostos fenólicos na simbiose micorrízica	12
3. MATERIAL E METODOS	22
3.1 Obtenção e desinfestação dos esporos	23
3.2 Experimentos de germinação e crescimento micelial ...	25
3.3 Análise estatística	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Germinação de esporos	30
4.2 Crescimento micelial	43
5. CONCLUSÕES	61
6. RESUMO	63
7. SUMMARY	66
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	69
9. APENDICE	80

LISTA DE TABELAS

tabela	Página
1 Flavonóides testados nos experimentos com <i>G. gigantea</i>	23
2 Meio nutritivo líquido modificado do meio de Hepper (Silva, 1990) para crescimento micelial	25
3 Resumo das análises de variância e regressão da porcentagem de germinação de esporos de <i>G. gigantea</i> no meio agar-água, suplementado com flavonóides. Dados transformados por $\ln(x+2)$. Esal, Lavras-MG, 1993.	31
4 Coeficiente de variação (%) para os valores de germinação de esporos de <i>G. gigantea</i> aos 2, 5 e 10 dias de incubação nos diversos experimentos.....	32
5 Porcentagem de inibição em relação ao controle e concentração inibitória máxima dos flavonóides sobre a germinação de <i>G. gigantea</i>	40
6 Resumo das análises de variância e regressão do crescimento micelial e produção de células auxiliares de <i>G. gigantea</i> em meio líquido suplementado com flavo- nóides. Dados transformados por $v(x+0,5)$. ESAL, Lavras - MG, 1993	45
7 Porcentagem de estímulo (+) ou inibição (-) do crescimento micelial de <i>G. gigantea</i> em relação ao controle e concentração mais ativa dos flavonóides	55

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Estrutura química dos flavonóides estudados.....	28
2 Efeito de flavonóis na germinação de esporos de G. gigantea no meio agar-água em diferentes períodos de incubação	33
3 Efeito de flavanonas na germinação de esporos de G. gigantea no meio agar-água em diferentes períodos de incubação	35
4 Efeito de isoflavonóides na germinação de esporos de G. gigantea no meio agar-água em diferentes períodos de incubação	37
5 Efeito de flavonas na germinação de esporos de G. gigantea no meio agar-água em diferentes períodos de incubação	38
6 Efeito de flavonóis sobre o crescimento micelial e produção de células auxiliares de G. gigantea em meio líquido	47
7 Efeito de flavanonas sobre o crescimento micelial e produção de células auxiliares de G. gigantea em meio líquido	49

Figura	Página
8 Efeito de isoflavonóides no crescimento micelial e produção de células auxiliares de <i>G. gigantea</i> em meio líquido	51
9 Efeito de flavonas no crescimento micelial e produção de células auxiliares de <i>G. gigantea</i> em meio líquido	53
10 Efeito de formononetina e quercetina sobre o crescimento micelial de <i>Glomus clarum</i> em meio líquido	58

1. INTRODUÇÃO

Dentre os metabólitos secundários produzidos pelas plantas, os compostos fenólicos constituem a classe mais ampla e de maior importância nos sistemas solo-planta, destacando-se os ácidos fenólicos, flavonóides e seus derivados como os principais fenólicos biologicamente ativos nos ecossistemas vegetais, (SIQUEIRA et alii, 1991a). Por muito tempo, considerou-se como principal função destes compostos a defesa constitutiva ou induzida das plantas contra e parasitas (NICOLSON & HAMMERSCHMIDT, 1992), onde a ação antifúngica desses compostos tem sido amplamente estudada./

Os mecanismos de alelopatia foram também atribuídos a uma variedade de compostos fenólicos presentes no solo, sendo seu envolvimento conhecido desde o início do século, quando foram referidos como toxinas do solo por Schreiner & Reed, 1908, citados por SIQUEIRA et alii (1991a). Nas interações entre plantas e planta-microrganismos, eles atuam como sinais moleculares importantes na indução de gens responsáveis por eventos que controlam os primeiros estágios da interação.

Apesar do papel reconhecido dos compostos fenólicos como sinais moleculares em sistemas simbióticos, pouco se conhece sobre seu envolvimento nas simbioses micorrízicas. Alguns estudos, no entanto, evidenciam o envolvimento de certos fenólicos na germinação de esporos (GIANINAZZI-PEARSON et alii, 1989; TSAI & PHILLIPS, 1991), crescimento micelial (NAIR et alii, 1991; BECARD et alii, 1992; CHABOT et alii, 1992) e colonização de raízes por fungos micorrízicos vesículo-arbusculares (WACKER et alii, 1990a; SIQUEIRA et alii, 1991b; SIQUEIRA et alii, 1991c). Esses estudos sugerem que os flavonóides são os responsáveis pela atividade dos exsudatos radiculares e metabólitos celulares sobre os fungos MVA, no entanto, evidências experimentais do envolvimento destes compostos como sinais moleculares ou mediadores nutricionais entre fungo e planta hospedeira é ainda objeto de estudo.

A ação estimulante desses compostos sobre os fungos MVA é de grande interesse considerando-se a necessidade de se elucidar os fatores necessários ao crescimento "in vitro" desses fungos que, como biotróficos obrigatórios não crescem e não esporulam na ausência de raízes vivas. A impossibilidade de se cultivar os fungos MVA "in vitro" tem dificultado a obtenção de inóculo em larga escala e conseqüentemente seu estudo e utilização prática.

No presente trabalho avaliaram-se os efeitos de diversos flavonóides de ocorrência natural nos vegetais, sobre a germinação de esporos e crescimento micelial assimbiótico de fungos MVA "in vitro".

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Compostos fenólicos no sistema solo-planta

Os compostos fenólicos formam uma das classes mais proeminentes de produtos vegetais, sendo muito reativos quimicamente e facilmente sujeitos a reações de oxidação, substituição e conjugação (BARZ & KOSTER, 1981). Dentre os compostos fenólicos produzidos pelas plantas e encontrados nos ecossistemas vegetais destacam-se os ácidos fenólicos, os flavonóides e seus derivados (SIQUEIRA et alii, 1991a). Os ácidos fenólicos são constituídos por uma ampla variedade de diferentes compostos orgânicos com pelo menos um grupo fenólico hidroxilado e um grupo carboxila, sendo comum usar essa designação associada a um número limitado de compostos naturais denominados ácidos cinâmicos e ácidos benzóicos (GROSS, 1981). O esqueleto carbônico dos ácidos cinâmicos se origina da desaminação enzimática do aminoácido L-fenilalanina catalizada pela enzima fênilalanina amônio-liase (FAL), reação esta que representa o primeiro passo da via fenilpropanóide. A molécula de ácido cinâmico formada pode

originar, por reações de hidroxilação e metilação, vários produtos derivados (GROSS, 1981). Os flavonóides constituem uma das classes de compostos mais características presentes em plantas superiores, muitos compõem os pigmentos das flores da maioria das angiospermas e estão presentes em todas as partes das plantas (HAHLBROCK, 1981).

As espécies vegetais exercem grande influência quantitativa e qualitativa sobre os compostos fenólicos presentes nos solos (SIQUEIRA et alii, 1991a). Parte dessa influência resulta de uma contribuição direta de compostos fenólicos do material vegetal ao solo. As gramíneas, por exemplo, contêm teores mais elevados de ácido ferúlico (extraído por NaOH 2M) nas suas raízes que outras espécies vegetais. Essa diferença é refletida em menor extensão nos extratos feitos em amostras de solo. GRAHAM (1991) caracterizou a distribuição de compostos fenólicos em plântulas e sementes de soja (*Glicine max L.*). Conjugados dos isoflavonóides daidzeína e genisteína foram os principais fenólicos nos órgãos embrionários dentro da semente, nas raízes, hipocótilo e cotilédone. Todas as seções de raízes apresentavam predominantemente daidzeína e seus conjugados, particularmente no ápice onde alcançavam os maiores níveis. Foram ainda detectadas a presença de conjugados de daidzeína, genisteína e vários metabólitos aromáticos não identificados nos exsudatos radiculares e nos exsudatos das sementes. Os conjugados eram rapidamente liberados a níveis (1 a 10 μ M) consistentes com seu papel potencial na quimiotaxia de microrganismos e indução da nodulação (SIQUEIRA et alii, 1991a; LYNN & CHANG, 1990).

Os compostos fenólicos estão sujeitos a vários fatores que reduzem sua concentração em solução, incluindo a rápida degradação pelos microrganismos (WHITEHEAD et alii, 1982; SIQUEIRA et alii, 1991a). FEDERSEN et alii(1991) compararam 2 avaliações consecutivas feitas em amostras de solo submetidas a monocultivo prolongado com aspargo. Após intervalo de 3 meses a concentração de fenólicos era reduzida, indicando que os fenólicos estão sujeitos a processos de degradação, imobilização e lixiviação, reduzindo sua atividade no solo.

Os compostos fenólicos liberados no solo exercem grande influência nos processos do sistema solo-planta-microrganismos, constituindo-se em um fator determinante da produtividade vegetal e do equilíbrio dinâmico de certos ecossistemas (SIQUEIRA et alii, 1991a). Os primeiros estudos envolvendo o papel dos compostos fenólicos nesses sistemas indicam sua relação com os efeitos alelopáticos. Grande número de compostos fenólicos já foram isolados e considerados como aleloquímicos. Estes incluem fenóis, ácidos fenólicos, coumarinas, flavonóides, isoflavonóides, taninos e uma variedade de conjugados fenólicos (SIQUEIRA et alii, 1991a). A presença de compostos fenólicos no solo e sua relação com os efeitos alelopáticos foram documentados inicialmente em cana-de-açúcar, trigo soja e milho (WANG, 1967) onde concentrações de até 1ppm de ácido p-hidroxibenzóico foram suficientes para reduzir o crescimento destas espécies.

Os compostos fenólicos podem afetar as plantas diretamente através do seu envolvimento no metabolismo celular, crescimento vegetal e diferenciação ou indiretamente nas funções

ecológicas vegetais (SIQUEIRA et alii,1991a). Uma das principais formas de ação desses compostos pode ser através da sua influência sobre os microrganismos do solo na rizosfera, destacando-se aqueles envolvidos no ciclo do nitrogênio. Os flavonóides da raiz podem afetar a fixação biológica de nitrogênio influenciando a formação e crescimento das raízes ou através de um efeito direto sobre os microrganismos relacionados. (RAO, 1990;SIQUEIRA et alii, 1991a). Fortes efeitos alelopáticos desses compostos foram verificados sobre as bactérias nitrificantes do solo,Nitrosomonas e Nitrobacter (RAO,1990).

2.2. Atividade de Compostos fenólicos em sistemas parasíticos

Ao lado de seu efeito deletério sobre as plantas e sobre a microbiota do solo (efeitos alelopáticos), os fenólicos atuam no mecanismo de defesa das plantas. Pode-se distinguir dois mecanismos de defesa, o ativo e o passivo, para descrever as toxinas antimicrobianas produzidas pelas plantas (BELL, 1981). Os compostos produzidos como mecanismo de defesa passiva são toxinas que ocorrem nos tecidos vegetais saudáveis e contribuem para a habilidade da planta em resistir a invasão de patógenos,já os compostos de defesa ativa são sintetizados ou liberados após a invasão microbiana. A maioria dos fenóis, no entanto, se acumula nos tecidos vegetais apenas após a infecção como parte da defesa ativa. A ativação dos mecanismos de defesa ativa com indução da biossíntese de compostos fenólicos envolve o reconhecimento molecular de produtos diretos e indiretos dos

gens de avirulência do patógeno (elicitores) (LAMB et alii, 1989).

Muitos flavonóides têm sido identificados como importantes fitoalexinas vegetais. A primeira a ser isolada e caracterizada foi a pisatina, um isoflavonóide de *Pisum sativum* (Cruickshank & Perrin, 1960 citados por BELL, 1981). Desde então, a maioria das fitoalexinas produzidas por leguminosas foi identificada como isoflavonóides, incluindo a daidzeína (KRAMER et alii, 1984), genisteína, biochanina A (WEIDENBORNER et alii, 1990) e vários outros (VANETTEN, 1976; STOSSEL, 1985; ADESANYA et alii, 1986; WEIDENBORNER et alii, 1989) com atividade antifúngica.

Em adição à ação dos compostos fenólicos como fitoalexinas e aleloquímicos, com efeitos tóxicos sobre os microrganismos, recentemente tem-se estudado sua função como sinais moleculares importantes na regulação do desenvolvimento de sistemas simbióticos. Os compostos fenólicos atuam como moléculas sinais no reconhecimento ou na indução dos primeiros estágios do desenvolvimento da simbiose. MORRIS & WARD (1992) observaram os efeitos de diversos compostos presentes nos exsudatos radiculares de soja sobre zoósporos de *Phytophthora sojae*. Foi verificado o quimiotropismo dos zoósporos pelos isoflavonóides isoformononetina, daidzeína e genisteína. Os compostos daidzeína e genisteína foram identificados como responsáveis pela atração e indução da germinação e encistamento dos zoósporos, passos essenciais para o início da infecção. A ação desses compostos sobre *P. sojae* requer uma estrutura química específica, pois compostos muito semelhantes como a formononetina e a biochanina A com diferenças apenas na

substituição do grupo metoxi pelo grupo -OH na posição 4 ,têm atividade extremamente reduzida. Os compostos fenólicos têm sido identificados como sinais moleculares em diversas outras relações entre plantas e microrganismos. Dentre as interações parasíticas mais estudadas, estão as observadas com Angiospermas parasíticas do gênero *Striga* e bactérias do gênero *Agrobacterium* causadoras de tumor.

A Angiosperma parasítica *Striga asiatica* (Scrophulariaceae) requer a união precoce ao hospedeiro (Gramíneas como milho trigo e sorgo) para o desenvolvimento contínuo, pois a germinação, adesão e penetração requerem o envolvimento de sinais específicos derivados da planta. Evidências indicam que esses sinais são compostos fenólicos simples (LYNN & CHANG, 1990). Da mesma forma, um sinal exógeno liberado nas raízes da planta hospedeira é necessário para a indução da formação do haustório da angiosperma parasítica *Agalinis purpurea*. STEFFENS et alii, 1982, isolaram dois flavonóides indutores a partir de *Astragalus* spp. e verificaram existir elevada especificidade entre estes compostos e *A. purpurea*.

Assim como ocorre com as Angiospermas parasíticas, a troca de sinais moleculares parece ser necessária para muitas interações planta microrganismos onde moléculas específicas iniciam respostas bioquímicas, fisiológicas ou morfológicas que afetam o desenvolvimento da interação (HALVERSON & STACEY, 1986). Recentemente, os compostos fenólicos como acetosiringones foram identificados como fatores de reconhecimento da planta hospedeira pela bactéria patogênica *Agrobacterium tumefaciens*. A expressão parasítica se inicia a partir do contato da bactéria

com o tecido hospedeiro danificado. Os genes bacterianos determinantes da virulência (VIR) levam à transferência do plasmídeo indutor de tumor Ti para as células da planta hospedeira iniciando a tumorigênese. Os genes VIR são induzidos pelos compostos fenólicos liberados pela planta no local da lesão (LYNN & CHANG, 1990; DIXON & LAMB, 1990). A necessidade da existência de uma lesão no tecido vegetal para a ocorrência da infecção é devida à necessidade de ligação das células bacterianas ao tecido hospedeiro e a liberação de compostos da via fenilpropanóide que induzem a transcrição dos genes VIR do patógeno. MELCHERS et alii (1989) identificaram vários compostos fenólicos como indutores desses genes, dentre eles, o ácido ferúlico, coniferilalcool, 3, 5-dimetoxi-4-hidroxibenzeno, ácido homovanílico, etc.

2.3. Compostos fenólicos na simbiose rizóbio-leguminosas.

Certas bactérias do solo conhecidas como "rizóbio" (gênero *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*), estabelecem associações simbióticas com leguminosas e não leguminosas do gênero *Parasponia* (VINCENT, 1988; LONG, 1989). As espécies de rizóbio de crescimento rápido apresentam grandes plasmídeos que carregam os genes necessários a simbiose. MARTINEZ et alii (1987) detectaram em *R. phaseoli* CFN 299, 3 plasmídeos A B e C de 185, 225 e 410 Kilobases respectivamente, responsáveis pela simbiose. A transferência desses plasmídeos para cepas de *A. tumefaciens* mostrou que apenas os transconjugantes com o plasmídeo

C (Plasmídeo simbiótico-SYM) nodularam os hospedeiros específicos de *R. phaseoli*. Aparentemente o plasmídeo C carrega os gens para especificidade e nodulação. Esses gens incluem uma série de gens contíguos e altamente estáveis designados nodD, A, B e C. Mutações nestes gens resultavam em cepas incapazes de curvar os pelos radiculares da planta hospedeira (HAC), um passo essencial para o início do processo de infecção (ROLFE & GRESSHOFF, 1988). MULLIGAN & LONG (1985), estudando fusões Lac Z em *E. coli* para monitorar a expressão de nodD e nodC de *R. meliloti*, verificaram que nodD é expresso a níveis comparáveis por bactérias expostas ou não a exsudatos vegetais. A atividade do nodC - Lac Z, no entanto, foi muito baixa em células não expostas a exsudatos vegetais e aumentava cerca de 30 vezes quando as células eram expostas a exsudatos se os níveis dos produtos de nodD eram altos. Estes resultados sugerem o papel dos produtos nodD como ativadores da expressão de outros gens nod na presença de exsudatos vegetais. Da mesma forma nodD está envolvido com a especificidade do rizóbio por seus hospedeiros. HORVATH et alii (1987) estudando transconjugantes de cepas de rizóbio MPIK 3030 (nodD1) com ampla faixa de hospedeiros e cepas de *R. meliloti* (nodD) nodulante de *Medicago sativa* (alfafa), observou que mutantes MPIK 3030 com gens nodD de *R. meliloti* eram incapazes de nodular siratro mas os mutantes *R. meliloti* com gens nodD1 se tornavam capazes de nodular siratro perdendo a especificidade original. Foi verificado que o produto nodD apresentava um resíduo carboxil terminal altamente variável que seria responsável pela interação com

exsudatos vegetais conferindo especificidade ao rizóbio.

Vários flavonóides foram identificados como indutores ou inibidores da nodulação através da sua interação com produtos dos gens *nodD* onde a proporção entre inibidor e estimulador (I/E) determina o efeito final dos compostos. Dentre os compostos indutores destacam-se várias flavonas, flavanonas e isoflavonas (FIRMIN et alii, 1986); isoflavonas: daidzeína e genisteína (KOSSLAK et alii, 1987); luteolina (KAPULNIK et alii, 1987); apigenina, eriodictyol (PETERS & LONG, 1988); flavona, flavanonas, chalconas (MAXWELL et alii, 1989; HARTWIG et alii, 1989); antocianidinas e flavonóis (HUNGRIA et alii, 1991). Os gens *nod* em algumas espécies de rizóbio são induzidos por mais de 20 flavonóides indutores diferentes, incluindo flavononas, flavonóis e flavonas. *R. meliloti*, no entanto, é induzido por apenas 8 compostos sendo os mais ativos, luteolina, dihidroxichalcona e 7,4'-dihidroxi-flavona. Vários flavonóides mostraram atividades antagonistas sobre a nodulação em alfafa por *R. meliloti* sendo o mais efetivo a coumarina umbeliferona e em seguida: Morina = narigenina > Kaempferol = Crisina > quercetina = fisetina = hespertina (PETERS & LONG, 1988). Segundo HORVARTH et alii (1987) a especificidade do hospedeiro pode ser determinada a nível da regulação do gen *NodD* e sua interação com os exsudatos radiculares. A ativação do produto dos gens *nodD* pelos flavonóides aparentemente leva a indução do operon dos gens *nod ABC* (Nod Box) iniciando a transcrição de produtos necessários ao estabelecimento da simbiose (ROLFE & GRESSHOFF, 1988). Parece provável que durante o processo normal de nodulação, a regulação dos gens *nod* do rizóbio esteja sujeita a ativação e ao

antagonismo por diferentes produtos vegetais. O número de nódulos, dessa forma, poderia ser determinado pelas relativas concentrações de indutores e anti-indutores presentes na rizosfera (FIRMIN et alii, 1986). Isto, no entanto, ainda não tem evidência experimental.

2.4. Compostos fenólicos na simbiose micorrízica

A simbiose entre plantas superiores e fungos micorrízicos é de grande interesse ecológico, agrícola e florestal. Inúmeras pesquisas mostram que a presença destes fungos no sistema radicular das plantas aumenta a absorção de nutrientes, principalmente daqueles com pequena mobilidade no solo como o fósforo (LOPES et alii, 1983). A capacidade das plantas de estabelecer relações simbióticas com fungos as tornam capazes de utilizar nutrientes que ocorrem em quantidades limitadas no solo, melhorando seu estado nutricional e crescimento. Além disso, as micorrizas podem aumentar a absorção de água, a resistência a períodos de estiagem e a patógenos do sistema radicular aumentando o crescimento e produção das plantas, principalmente em solos de baixa fertilidade. Isto pode reduzir a demanda de fertilizantes e pesticidas e os danos ambientais decorrentes de sua utilização na agricultura (SIQUEIRA, 1986).

O termo micorriza, foi designado inicialmente por Frank, 1885, citado por LOPES et alii (1983) e compreende as associações mutualistas simbióticas entre fungos do solo e

radicelas das plantas nas quais ambos os membros se beneficiam da interação. Segundo LEWIS (1975), as micorrizas são classificadas em ectomicorrizas e endomicorrizas. Dentro do grupo das endomicorrizas destaca-se a importância das micorrizas vesículo-arbusculares (MVA) pela sua maior ocorrência no reino vegetal e pelos seus efeitos no crescimento e produtividade das plantas (SIQUEIRA, 1986). As micorrizas vesículo-arbusculares foram recentemente classificadas na nova ordem Glomales que inclui fungos do solo que formam arbúsculos em associações mutualistas obrigatórias com plantas terrestres. Essa ordem inclui a subordem Glomineae com as famílias Glomaceae (gêneros *Glomus* e *Sclerocystis*) e Acaulosporaceae (gêneros *Acaulospora* e *Entrophospora*) e a subordem Gigasporineae com a família Gigasporaceae (gêneros *Gigaspora* e *Scutellispora*), (MORTON & BENNY, 1990).

Durante o estabelecimento da simbiose, os propágulos (esporos) germinam na rizosfera e imediatamente após o contato com as células do hospedeiro, o fungo forma um apressório, o que indica a ocorrência de algum processo de reconhecimento específico. Nesse estágio é provável que genes fúngicos, ainda não identificados sejam ativados quando o fungo entra em contato com os tecidos do hospedeiro, levando ao crescimento e diferenciação morfológica do fungo na raiz (GIANINAZZI, 1991). As MVA formam no interior das raízes estruturas de hifas curtas e ramificadas denominadas arbúsculos que são responsáveis pelas trocas de metabólitos com a célula vegetal. A presença da planta

hospedeira é particularmente importante para o crescimento e esporulação dos fungos MVA que como biotróficos obrigatórios não crescem na ausência das raízes da planta hospedeira impossibilitando seu cultivo "in vitro" em condições axênicas (SIQUEIRA et alii, 1985). Dessa forma, apesar dos benefícios que trazem ao crescimento e produtividade das plantas, o estudo e utilização prática desses fungos são ainda muito limitados.

Vários estudos têm sido realizadas com o objetivo de determinar os fatores essenciais para o crescimento assimbiótico dos fungos MVA visando seu cultivo "in vitro" (SIQUEIRA et alii, 1985). Segundo SIQUEIRA & HUBBELL(1986), as condições de cultivo, especialmente aquelas relacionadas a nutrição estariam entre os principais fatores que influenciariam a germinação dos esporos e o crescimento do tubo germinativo dos fungos MVA "in vitro" e também no solo. Diversos fatores de natureza química, física e biológica tem sido testados, incluindo: variações de pH (KOSKE, 1981; SIQUEIRA et alii, 1982, 1984, 1990) potencial hídrico (KOSKE, 1981; TOMMERUP, 1984), temperatura (KOSKE, 1981), concentração de sais (SIQUEIRA et alii, 1982; LOUIS & LIM, 1988), vitaminas (HEPPER & SMITH, 1976; SIQUEIRA et alii, 1982), substratos orgânicos como açúcares e ácidos orgânicos (SIQUEIRA & HUBBELL,1986; SIQUEIRA et alii, 1982), aminoácidos (SILVA, 1990; HEPPER & SMITH, 1976; HEPPER & JACKOBSEN, 1983; FREITAS, 1990) e extratos de solo (SIQUEIRA & HUBBELL,1986). Dentre os inúmeros fatores nutricionais testados, vários apresentaram efeitos estimulatórios sobre a germinação e o crescimento. Verifica-se, no entanto, que os esporos de fungos MVA parecem conter

as informações biológicas necessárias à germinação e crescimento inicial do tubo germinativo na ausência de raízes vivas. A inabilidade destes fungos de crescer axênicamente por períodos prolongados estaria associada com alguma deficiência metabólica durante a fase filamentosa (SIQUEIRA & HUBBELL, 1986) que seria sanada pela presença da planta hospedeira. Segundo HEPPER (1983) o crescimento de hifas destacadas do esporo ocorre durante dez dias, após esse período a taxa de crescimento é reduzida e a hifa sofre autólise, caracterizando um processo de senescência. A repicagem ou a adição de nutrientes ao meio de cultivo não reativa o crescimento, indicando sua dependência das reservas nutritivas do esporo ou da associação com a raiz hospedeira. BECARD & PICHÉ (1989), demonstraram que as raízes contribuem para o crescimento fúngico através de dois mecanismos: um primeiro indutivo (M_1) e um segundo nutricional (M_2). A inabilidade dos fungos MVA em crescer em cultura pura apesar da grande quantidade de energia estocada em seus esporos indicam a necessidade absoluta de fatores de indução fornecidos pela planta hospedeira. A indução pela raiz pode ocorrer através de um sinal químico que estimula diretamente o crescimento fúngico ou através da remoção de um auto-inibidor fúngico. Dessa forma, a presença da raiz capacita o fungo a utilizar suas próprias reservas como fonte de energia (M_1) permitindo o crescimento das hifas fúngicas e o início do processo de infecção. O desenvolvimento fúngico e as reações do hospedeiro criam áreas de contato entre as superfícies das células dos simbiossitos a partir da formação dos

arbúsculos e provêm condições altamente favoráveis para as trocas de nutrientes (GIANINAZZI, 1991). O fornecimento de nutrientes do hospedeiro às hifas fúngicas constitui o segundo mecanismo (M_2) através do qual as raízes estimulam o crescimento fúngico. Vários estudos procuraram demonstrar o papel dos exsudatos de raiz como possíveis estimuladores da germinação e crescimento micelial de fungos MVA. GRAHAM (1982) verificou que a germinação de *Glomus epigaeum* foi aumentada de 10% a 27% quando os esporos eram expostos a exsudatos de raiz de mudas de *Citrus*. Esse estímulo, no entanto foi inespecífico e aparentemente de efeito quantitativo e não qualitativo o que explicaria a falta de especificidade. PAULA & SIQUEIRA (1990) observaram o aumento do crescimento das hifas de *Gigaspora margarita* "in vitro" com a adição de suspensões, exsudatos e extratos celulares de *Pueraria phaseoloides* Benth. Os exsudatos e extratos celulares estimularam o crescimento a baixas concentrações, sendo inativos ou mesmo inibitórios a concentrações mais elevadas. Esses resultados demonstraram que os efeitos estimulatórios das células vegetais resultam, da produção de reguladores requeridos em pequenas quantidades e não de fatores nutricionais, ELIAS & SAFIR (1987) observaram que exsudatos de raízes de trevo (*Trifolium repens*) cultivados em solução nutritiva sem fósforo eram mais estimulantes para o alongamento das hifas de *Glomus fasciculatum* que os exsudatos de plantas bem supridas com fósforo. Esses resultados indicam que fatores presentes nos exsudatos de plantas deficientes em fósforo eram responsáveis pelo estímulo no crescimento micelial. NAIR et alii (1991) isolaram destes exsudatos compostos capazes estimular o

crescimento assimbiótico desses fungos. Esses compostos foram identificados como isoflavonóides, sendo um destes a formononetina, sintetizada em laboratório e patenteada como estimulante de fungos MVA (U.S. patent nº 5.002.603; 5.125.955 e 5.085.682). Esses compostos aumentaram as taxas de colonização micorrizica quando aplicados ao solo em concentrações baixas (5 mg/l), levando a um maior crescimento das plantas (SIQUEIRA et alii, 1991b). Quando aplicados em solo livre de propágulos de fungos MVA, não mostraram efeitos estimulantes no crescimento vegetal ou na nodulação indicando seus efeitos via colonização micorrizica . GIANINAZZI-PEARSON et alii (1989) estudaram a influência de flavonóides indutores dos gens Nod de rizóbio sobre a germinação e crescimento dos fungos micorrizicos. Eles observaram que os compostos narigenina, hespertina e apigenina estimularam o crescimento assimbiótico do fungo *G. margarita* nas concentrações 0,15 a 1,5 μ M. SIQUEIRA et alii (1991c) examinaram os efeitos de vários flavonóides na colonização micorrizica e crescimento do trevo. As aplicações ao solo dos isoflavonóides formononetina e biochanina A em concentrações de 5 mg/l e da flavona chrysin em concentrações mais elevadas aumentaram a colonização micorrizica por *Glomus* sp e o crescimento do trevo. Os isoflavonóides formononetina e biochanina A, previamente isolados desta planta (NAIR et alii, 1991) exibiram elevada atividade biológica no estímulo da colonização micorrizica, enquanto outros flavonóides testados mostraram-se inativos na concentração de 5 mg/l. TSAI & PHILLIPS (1991) relataram que outros compostos fenólicos flavonóides,

indutores de gens Nod como a quercetina, um flavonol exsudado de sementes de alfafa (*Medicago sativa* L.), estimularam a germinação e alongamento das hifas de *Glomus etunicatum* quando em concentrações de 1 a 2,5 μ M. Outros flavonóides exudados de raízes, 4'-7-dihidroxi-flavona e 4',7'-dihidroxi-flavonona estimularam igualmente a germinação de *G. etunicatum*. Já a formononetina, também presente nos exsudatos de alfafa mostrou-se inibitória (2,5 μ M) sobre esporos de *G. etunicatum* e *Glomus macrocarpum*. Recentemente, BECARD et alii (1992), testando vários flavonóides em concentração de 10 μ M, observaram que apenas os flavonóis quercetina, miricetina e kaempferol, estimulavam o crescimento das hifas de *G. margarita*, enquanto as flavonas apigenina e flavona; a flavanona hesperetina e isoflavona biochanina A, foram inibitórias. Esses resultados contrastaram com os obtidos por GIANINAZZI-PEARSON et alii (1989) e NAIR et alii (1991) que verificaram efeitos estimulatórios desses compostos. No entanto, a comparação entre os diversos experimentos se torna difícil, uma vez que foram utilizadas concentrações diferentes dos compostos (0,15 a 1,5 μ M por Gianinazzi-Pearson et alii, 1989) e espécies fúngicas distintas (*Glomus* sp por Nair et alii, 1991). CHABOT et alii (1992) verificaram também efeitos estimulatórios dos flavonóis a 10 μ M sobre o crescimento das hifas de *G. margarita*. LEI et alii (1991) verificaram que a atividade da ATPase de membrana no ápice das hifas de *G. margarita* era estimulada pela presença de exsudatos radiculares, indicando um possível mecanismo de ação para esses compostos.

Os determinantes genéticos da planta que controlam a infecção micorrízica parecem estar amplamente relacionados com os

gens envolvidos no controle da nodulação. DUC et alii (1989), observou que mutantes de *Fisum sativum* L. e *Vicia faba* L., não micorrízicos (MYC), eram muitas vezes também incapazes de nodulação (NOD) indicando uma estreita ligação entre as características MYC e NOD e uma relação entre os determinantes genéticos que controlam os dois processos.

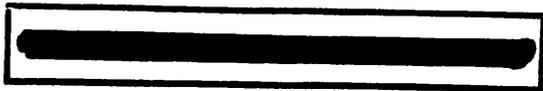
Os compostos fenólicos apresentam efeitos diferenciados sobre os fungos micorrízicos. Esses efeitos podem variar com a natureza do composto e com sua concentração no meio. WACKER et alii (1990b) verificaram efeitos inibitórios do ácido ferúlico sobre o crescimento das hifas e colonização micorrízica do aspargo. O ácido ferúlico nas concentrações de 50 - 400 ug/g não mostrou efeito sobre a germinação dos esporos mas reduziu significativamente o crescimento micelial e a colonização micorrízica. Esses efeitos inibitórios foram também verificados no crescimento das plantas, produzindo dessa forma um forte efeito alelopático. PEDERSEN et alii (1991) verificaram que a aplicação de soluções contendo ácidos fenólicos (ferúlico, cafeico e ácido metilenodioxicinâmico-MDCA) próximo as raízes de mudas de aspargo reduziam significativamente a colonização micorrízica das raízes. Os efeitos deletérios desses compostos sobre os fungos micorrízicos podem explicar as alterações de populações fúngicas em solos onde se praticou historicamente o monocultivo. Diferentes espécies de fungos micorrízicos parecem mostrar tolerância diferenciada aos compostos fenólicos presentes no solo. WACKER et alii (1990a) relatou mudanças na composição de espécies micorrízicas do solo

com o aumento do tempo de monocultura de aspargo. SIQUEIRA et alii, (1991a) sugere que as variações nas populações micorrízicas durante o período de monocultura poderiam refletir uma tolerância diferencial das espécies de fungos MVA aos compostos fenólicos do solo. Elevada tolerância aos fenólicos do solo pode ser observada nos Urzais (Heathland ecosystems) com altas concentrações de ácidos fenólicos e orcinol. O fungo endomicorrízico ericóide *Hymenoscyphus ericae* pode facilmente metabolizar ácidos benzóicos e p-metoxibenzóicos, detoxificando o ambiente e possibilitando a sobrevivência da planta hospedeira *Calluna vulgaris* em solo altamente alelopático (SIQUEIRA et alii, 1991a). Nos ecossistemas de coníferas, os níveis de compostos fenólicos podem também atingir níveis tóxicos aos fungos ectomicorrízicos. A seleção de combinações fungo hospedeiro tolerantes aos fenólicos aleloquímicos possibilitando a obtenção de elevadas taxas de colonização pode ser um importante mecanismo de proteção das espécies vegetais contra os efeitos fitotóxicos dos alelopáticos.

Pouco se sabe sobre os efeitos dos compostos fenólicos sobre os fungos ectomicorrízicos. LINDENBERG & LINDENBERG (1980) verificaram efeitos estimulantes dos compostos fenólicos sobre basidiomicetos saprofíticos decompositores da liteira. Um glicosídeo de taxifolina extraído de *Pinus*, na concentração de 5 mg/l aumentou significativamente a taxa de crescimento de *Marasmius androsaceus*. Outros flavonóides: flavononas, flavonois dihidroxichalconas, e antocianinas, assim como ácido gálico apresentaram efeitos semelhantes. Outros fungos decompositores, no entanto, e alguns fungos ectomicorrízicos parecem não ser

afetados pelos flavonóides.

Considerando-se o importante papel dos compostos fenólicos no desenvolvimento de diversas simbioses patogênicas e mutualísticas e as evidências de um efeito estimulante sobre o crescimento micelial assimbiótico de fungos MVA e colonização micorrízica, torna-se evidente que esses compostos geralmente liberados como exsudatos radiculares, parecem ter papel fundamental no desenvolvimento e funcionamento da simbiose micorrízica. Considerando-se um possível efeito diferencial dos diversos compostos fenólicos sobre os fungos micorrízicos, torna-se necessária a condução de estudos visando determinar os efeitos dos diversos compostos fenólicos de ocorrência natural nas plantas superiores sobre a germinação e crescimento micelial de fungos micorrízicos "in vitro". Os efeitos estimulantes de alguns desses compostos os colocam como promissores componentes de meios de cultura objetivando o cultivo axênico desses organismos e como sinais moleculares na relação fungo-planta.



3. MATERIAL E METODOS

Para avaliar os efeitos de compostos fenólicos na germinação e crescimento micelial dos fungos MVA *Gigaspora gigantea* (Nicolson & Gerdemann) Gerdemann & Trappe e *Glomus clarum* Nicolson & Schenk, experimentos foram conduzidos no laboratório de Microbiologia do Solo da Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), Lavras - MG.

Os ensaios de germinação consistiram na adição de diversos compostos fenólicos, em várias concentrações (Tabela 1), ao meio básico ágar-água 1% (SIQUEIRA et alii, 1982), sendo determinada a porcentagem de esporos de *G. gigantea* germinados em cada tratamento. Nos ensaios de crescimento micelial, esporos pré-germinados de *G. gigantea*, foram transferidos para meio líquido suplementado com os compostos fenólicos nas várias concentrações (Tabela 1). Foram avaliados também, os efeitos do isoflavonóide formononetina (0,5µM; 5,0µM; 50µM) e do flavonol quercetina (1µM; 10µM; 50µM) sobre o crescimento micelial de *Glomus clarum*. As concentrações testadas foram definidas com base em outros estudos (GIANINAZZI-PEARSON et al, 1989; TSAI & PHILLIPS, 1991; BECARD et al, 1992) e em ensaios prévios incluindo uma ampla faixa de concentrações.

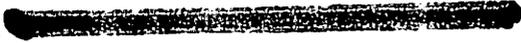


Tabela 1: Flavonóides testados nos experimentos com *G. gigantea*

Nome Comum	Nome Químico	Peso Molecular	Faixa de Concentração (uM)	
			Germinação	Crescimento Micelial
Isoflavonóides				
Formononetina ^{3,8}	7-hidroxi-4'-methoxiisoflavona	320,53	0 - 400	0 - 10
Biochanina A ¹	Diidroxi 4'-methoxiisoflavona	284,30	0 - 400	0 - 10
Genisteína ⁵	4',5,7-trihidroxiisoflavona	270,23	0 - 200	0 - 10
Daidzeína ²	4',7-dihidroxiisoflavona	254,23	-	0 - 10
Flavononas				
Naringenina ¹	4',5,7-trihidroxi-flavanona	272,30	0 - 200	0 - 10
Hesperetina ¹	3,5,7-trihidroxi-4'-methoxi-flavanona	302,27	0 - 400	0 - 10
Taxifolina ¹	3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavanona	304,30	0 - 200	0 - 10
Flavonóis				
Fisetina ⁴	3,3',4',7-tetrahidroxiflavona	286,24	0 - 50	0 - 10
Morina ¹	2,3,4',5,7-pentahidroxi-flavona	302,20	0 - 400	0 - 10
Kaempferol ¹	3,4',5,7-tetrahidroxiflavona	286,20	-	0 - 10
Myricetina ¹	3,3',4',5,5',7-hexahidroxi-flavona	318,20	-	0 - 10
Quercetina ¹	3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona	338,26	0 - 200	0 - 50
Flavonas				
Apigenina ¹	4',5,7-trihidroxi-flavona	270,24	0 - 200	0 - 10
Flavona ⁴	2-phenil-1,4-benzopirona	222,24	0 - 100	0 - 10

† Origem dos Compostos - 1-Sigma: St.Louis, MO 6317 SA
 2-Research Plus: Bayonne, New Jersey, USA
 3-American Cyanamid: Princenton, New Jersey, USA
 4-Aldrich Chem. Co.: Milw. W153201
 5-Adams Chem. Co.: Round Lake, Illinois 60073

3.1 Obtenção e desinfestação dos esporos

Os esporos de *G. gigantea* e *G. clarum* foram multiplicados em raízes de *Brachiaria decumbens* Stapf Prain cultivada em vasos contendo 4 kg de uma mistura de solo e vermiculita na proporção 3:1 desinfestada com Brometo de Metila (260 cc/m³ de substrato). Os vasos foram mantidos em casa de vegetação por 12 a 14 meses para multiplicação dos esporos.

Durante o cultivo, os vasos foram irrigados diariamente com água desmineralizada e a cada 10 dias com 10 ml de solução de Hoagland sem fósforo diluída 10x.

A cada experimento, os esporos foram extraídos de amostras de solo coletadas diretamente dos vasos de multiplicação, por peneiramento úmido conforme método de GERDEMANN & NICOLSON (1963), em peneiras com malhas de 0,71 e 0,053 mm de abertura. O material obtido foi centrifugado em água por 3 minutos a 3000 rpm e em solução de sacarose 30% a 2000 rpm por 2 minutos. Os esporos presentes no sobrenadante foram recolhidos em peneira com 0,044 mm de abertura, lavados com água corrente e, em seguida, foram observados sob microscópio estereoscópico (20x) para seleção de um grupo morfológicamente homogêneo, descartando-se esporos escuros ou danificados. Os esporos selecionados foram transferidos com auxílio de seringa de vidro para unidades de filtração estéreis (filtro Millipore Swinex 25) com membrana de papel (whatman n 1) em câmara asséptica de fluxo laminar. A desinfestação da superfície dos esporos foi feita por lavagem com 20 ml de solução de hipoclorito de sódio 1% (V/V, 5% de cloro livre) por 10 minutos seguida de lavagem com 20 ml de estreptomicina 100 ppm por 20 minutos, conforme descrito por COLOZZI-FILHO (1988). Os esporos desinfestados foram transferidos, com auxílio de pinça de ponta fina, do filtro para placas de petri (9,0 cm de diâmetro) contendo 10 ml de agar-água 1% (PH $6,4 \pm 0,2$) para germinação. As placas foram vedadas com filme plástico e incubadas em estufa 28°C no escuro e, após os períodos de incubação, foram submetidas a observação sob microscópio estereoscópico (20x) para verificação da germinação.

3.2 Experimentos de germinação e crescimento micelial

Espóros desinfestados de *G. gigantea* foram submetidos a ensaios de germinação em placas de petri contendo meio básico agar água 1% (SIQUEIRA et alii, 1982) e ensaios de crescimento micelial em meio líquido modificado do meio de Hepper, 1979 (SILVA, 1990), (Tabela 2). Os compostos fenólicos (Figura 1) foram adicionados ao meio sólido e líquido após serem dissolvidos em pequeno volume de metanol que não ultrapassou 1% do volume final total do meio (SIQUEIRA et al, 1991c).

Tabela 2: Meio nutritivo líquido modificado do meio de Hepper para crescimento micelial (SILVA, 1990).

Compostos	Marca	Concentração mg/l
KCl	Merck	4,00
KNO ₃	Merck	6,40
MgSO ₄ .7 H ₂ O	Berzog	4,00
Ca(H ₂ PO ₄) ₂ . H ₂ O	Riedel-de-haen	0,80
FeNa EDTA	Reagen	0,19
Tiamina	Merck	0,40
Biotina	Merck	0,40
Cianocobalamina	Merck	0,04
Sacarose	Merck	2000

Obs: pH final ajustado com NaOH e HCl (1N) para $5,2 \pm 0,2$

Nos ensaios de germinação, os compostos fenólicos dissolvidos em metanol foram incorporados ao agar-água fundido e mantido a 60°C. Foram feitas diluições sucessivas do agar para obtenção das diversas concentrações. O controle foi preparado pela incorporação das mesmas quantidades de metanol ao agar-água fundido a 60°C. Foram utilizadas para cada tratamento parcelas

experimentais constituídas por uma placa com 20 esporos e 4 repetições (80 esporos) em delineamento inteiramente casualizado. Os esporos desinfestados foram transferidos para cada placa de petri (9,0 cm de diâmetro) contendo 10 ml de agar-água 1% suplementado com os compostos fenólicos e incubados a 28°C no escuro. Foram feitas avaliações periódicas da porcentagem de esporos germinados após 2, 5 e 10 dias de incubação. As observações foram feitas sob microscópio estereoscópico (20x), sendo considerados germinados os esporos que apresentavam um ou mais tubos germinativos (SIQUEIRA, 1983).

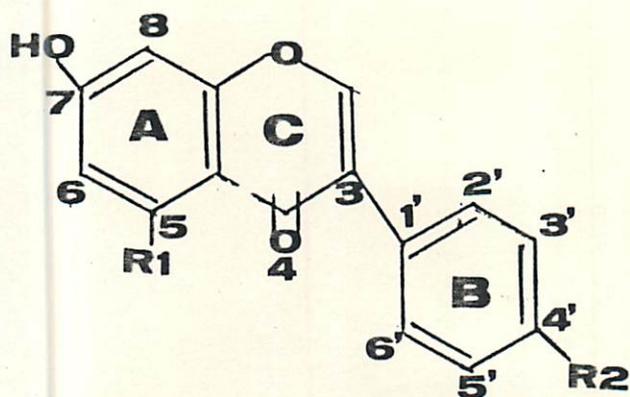
Nos ensaios de crescimento micelial, esporos de *G. gigantea* e *G. clarum* pré-germinados em agar-água puro e livre de contaminantes, foram transferidos para tubos de ensaio de vidro (1,8 x 12,5cm) contendo 3ml do meio líquido (Tabela 2), suplementado com os compostos fenólicos nas diversas concentrações. Os flavonóides, dissolvidos em metanol, foram adicionados ao meio líquido que foi diluído várias vezes para obtenção das concentrações desejadas. O controle foi preparado pela adição das mesmas quantidades de metanol ao meio líquido. Foram testados os efeitos de diversos flavonóides sobre o crescimento micelial de *G. gigantea* (Tabela 1), e do isoflavonóide formononetina (0,5µM; 5,0 µM; 50µM) e do flavonol quercetina (1,0µM; 10µM; 50µM) sobre o crescimento micelial de *G. clarum*. Em cada tratamento foram utilizadas parcelas experimentais de 10 tubos com 1 esporo por tubo e 3 repetições (30 esporos) por tratamento em delineamento inteiramente casualizado.

Os esporos foram transferidos do meio sólido com o auxílio de uma espátula através da remoção de fragmento circular

de ágar previamente marcado na placa. Cada fragmento com cerca de 0,5 cm de diâmetro continha apenas 1 esporo germinado livre de contaminantes. Os tubos foram incubados em estufa a 28°C no escuro por um período de 15 dias, suficiente para o crescimento máximo de *G. gigantea* (SILVA, 1990) e 25 dias para o crescimento de *G. clarum*.

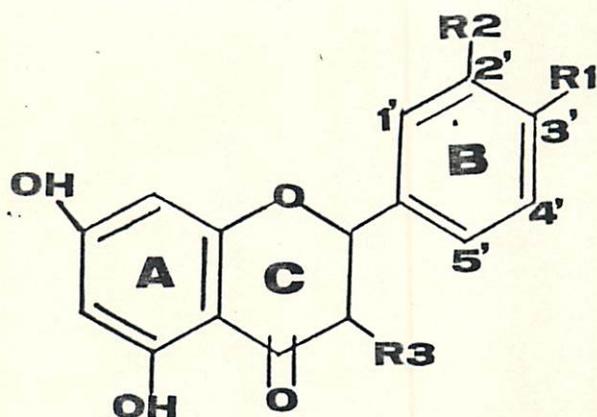
Após o período de incubação, os tubos foram observados sob microscópio estereoscópico (40x) para contagem do n^o de células auxiliares produzidas nos experimentos com *G. gigantea* e para verificação da presença de contaminantes. Para avaliação do crescimento micelial, utilizou-se o método de interseções de hifas modificado de HEPPEL & JAKOBSEN (1983). O micélio de cada parcela foi agrupado em um tubo de ensaio (1,8 x 12,5 cm) contendo cerca de 5 ml de água destilada e 50 contas de vidro (1mm de diâmetro). O micélio foi fragmentado por agitação em vórtex a 1/3 da velocidade máxima por trinta segundos. Os fragmentos obtidos foram transferidos para membrana Millipore quadriculada (HAGB 47, 9mm² por quadricula) por filtração a vácuo. Após secagem da membrana de filtro ao ar, procedeu-se a contagem sob microscópio estereoscópico (40x) do n^o de fragmentos de hifas que interceptavam as linhas horizontais e verticais da membrana. O meio líquido proveniente de cada parcela foi recolhido para determinação do pH.

A - Isoflavonoides



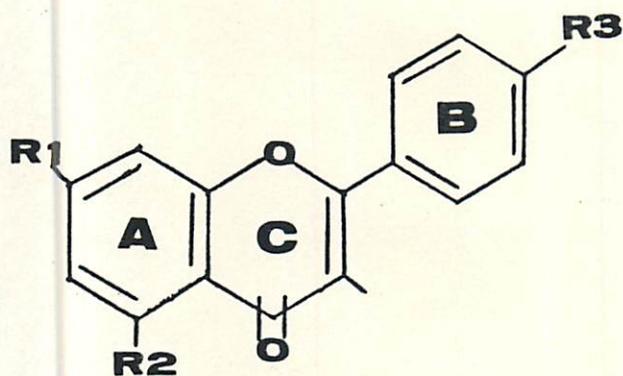
	R1	R2
Genisteina	OH	OH
Daidzeina	H	OH
Formononetina	H	OCH3
Biochanina A	OH	OCH3

B - Flavanonas



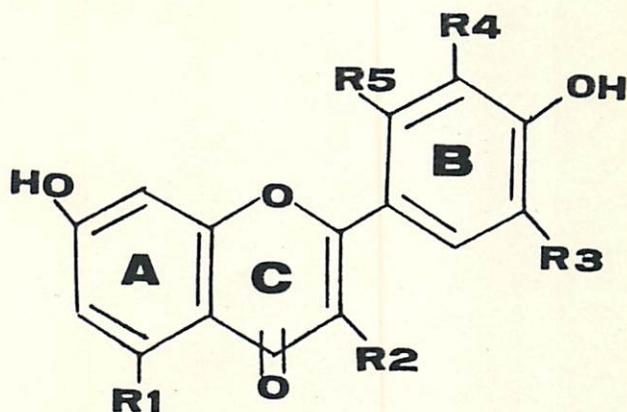
	R1	R2	R3
Hesperetina	OCH3	OH	H
Naringenina	OH	H	H
Taxifolina	OH	OH	OH

C - Flavonas



	R1	R2	R3
Apigenina	OH	OH	OH
Flavona	H	H	H

D - Flavonois



	R1	R2	R3	R4	R5
Kaempferol	OH	OH	H	H	H
Myricetina	OH	OH	OH	OH	OH
Quercetina	OH	H	OH	OH	H
Morina	OH	H	H	H	OH
Fisetina	H	OH	H	OH	H

Figura 1. Estrutura química dos flavonóides estudados

3.3 Análise Estatística

Os dados relativos a porcentagem de germinação foram transformados por $Y = \ln(x + 2)$, os dados de contagem de interceções de hifas e \log de células auxiliares foram transformados por $Y = v(x + 0,5)$. Nos experimentos de crescimento micelial, as concentrações foram transformadas pela expressão $\log(x+1)$, visando facilitar os ajustes das respostas, obtendo-se os seguintes valores: $1\mu\text{M} = 0,301$; $5\mu\text{M} = 0,778$; $10\mu\text{M} = 1,041$; $50\mu\text{M} = 1,707$. Todos os dados foram submetidos a análise de variância e regressão polinomial de acordo com o programa SANEST do Instituto Agronomico de Campinas (IAC), São Paulo.

4.RESULTADOS E DISCUSSAO

4.1 Germinação de Esporos

A germinação de esporos de *G. gigantea* no meio agar-água iniciou-se após 2 dias de incubação, sendo verificada a formação de um ou mais tubos germinativos diretamente da parede do esporo, conforme descrito para espécies azigospóricas (SIQUEIRA et alii, 1985). A germinação dos esporos foi elevada, variando significativamente ($P > 0,05$) entre 61% aos 2 dias, 82% aos 5 dias e 87% aos 10 dias de incubação, alcançando níveis semelhantes aos observados em outros estudos (KOSKE, 1981). Após a germinação, o tubo germinativo cresceu rapidamente, produzindo, aos 5 dias, filamentos de 2-3 cm que se ramificaram lateralmente, crescendo no interior e na superfície do ágar.

A adição dos diversos flavonóides ao meio agar-água exerceu efeitos inibitórios significativos sobre a germinação dos esporos de *G. gigantea* (Tabelas 3 e 1A-4A). Verificou-se ainda, durante os períodos de incubação, uma redução no coeficiente de variação da germinação aos 2, 5 e 10 dias (Tabela 4). Essa redução na variabilidade das taxas de germinação foi

Tabela 3. Resumo das análises de variância e regressão da porcentagem de germinação de esporos de *G.gigantea* no meio agar-água suplementado com flavonóides. Dados transformados por $\ln(x+2)$. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Compostos/ tempo(dias)	Anava		Equação de regressão	r^2	Nível de Significância da regressão
	Quadrado Médio	Nível de Significância			
Morina /2	5,7914296	0,00078	$Y=3,9465-0,01357X$	0,9279	0,00018
Morina /5	6,5968193	0,00001	$Y=4,3994+0,00132X-0,000075X^2$	0,9980	0,00376
Morina /10	0,9583804	0,00004	$Y=4,4060+0,00240X-0,000037X^2$	0,9781	0,00330
Quercetina /2	0,2506474	0,00372	$Y=4,25495-0,1267X-0,007527X^{0,5}$	0,7600	0,0791
Quercetina /5	0,0105767	0,05185	-	-	-
Quercetina/10	0,0041556	0,14925	-	-	-
Fisetina /2	4,9402115	0,00001	$Y=4,5389-0,20485X+0,003566X^2$	0,9306	0,00201
Fisetina /5	0,2312762	0,00175	$Y=4,5186+0,01666X-0,002764X^2+0,0000468X^3$	0,9998	0,01327
Fisetina /10	0,0420691	0,00288	$Y=4,5713+0,00756X-0,001202X^2+0,00002025X^3$	0,9993	0,01711
Naringenina/2	5,0013614	0,00007	$Y=4,3752-0,00706X$	0,9967	0,00001
Naringenina/5	3,8604984	0,00015	$Y=4,8059-0,00581X$	0,8739	0,00003
Naringen. /10	2,9175325	0,00094	$Y=4,8405-0,00487X$	0,8123	0,00019
Hesperetina/2	5,2007400	0,00008	$Y=4,5619-0,02682X+0,000061X^2$	0,9541	0,00001
Hesperetina/5	2,3402566	0,00002	Sem ajuste	-	-
Hesperet. /10	1,6985658	0,00001	Sem ajuste	-	-
Taxifolina /2	7,2789688	0,00001	$Y=3,9739-0,01688X$	0,9790	0,00001
Taxifolina /5	0,3285601	0,00044	$Y=4,4314-0,00353X$	0,9470	0,00006
Taxifolina/10	0,0627268	0,00468	$Y=4,5409-0,00150X$	0,9239	0,00048
Flavona /2	8,1588930	0,00001	$Y=4,4822-0,03519X$	0,9489	0,00001
Flavona /5	10,2456916	0,00001	$Y=4,9547-0,0380X$	0,8820	0,00001
Flavona /10	10,8869987	0,00001	$Y=5,0804-0,03875X$	0,8622	0,00001
Apigenina /2	0,1886967	0,16871	-	-	-
Apigenina /5	0,0314969	0,40744	-	-	-
Apigenina /10	0,0288179	0,28223	-	-	-
BiochaninaA/2	1,5916266	0,05744	$Y=3,4539-0,00389X$	0,9505	0,00478
Biochan.A /5	0,2610916	0,00039	$Y=4,0820-0,00159X$	0,9682	0,00005
Biochan.A /10	0,1040282	0,01178	$Y=4,1634-0,00096X$	0,8862	0,00127
Formonon. /2	0,0092069	0,96741	-	-	-
Formonon. /5	0,0126232	0,57426	-	-	-
Formonon. /10	0,0184768	0,36899	-	-	-
Genisteina /2	0,1080468	0,30174	-	-	-
Genisteina /5	0,0005841	0,97756	-	-	-
Genisteina/10	0,0002399	0,98601	-	-	-

também constatada por SAFIR et alii (1990) e provavelmente indica uma sincronização na germinação dos esporos decorrente do vencimento do período de dormência característico dos esporos de fungos MVA.

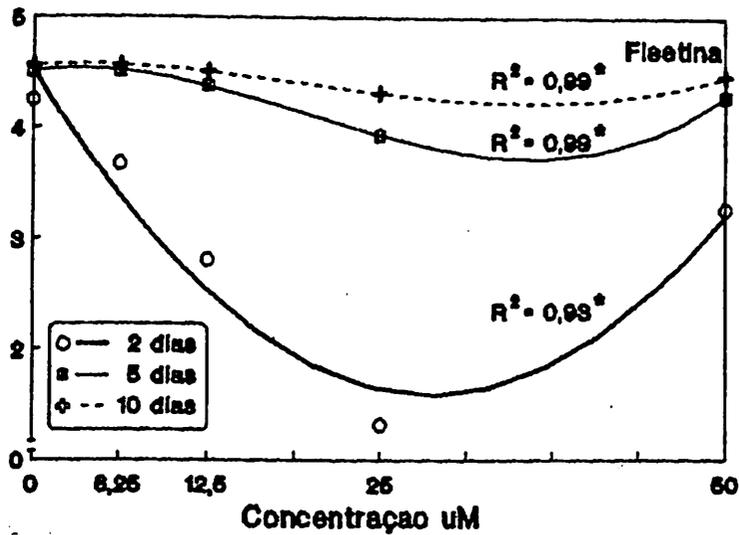
Tabela 4: Coeficientes de variação (%) para os valores de germinação de esporos de *G.gigantea* aos 2, 5 e 10 dias de incubação nos diversos experimentos.

Composto	2 Dias	5Dias	10 Dias
Morina	20,41	9,42	10,54
Quercetina	13,15	4,48	5,97
Fisetina	24,49	18,57	9,50
Flavona	38,90	26,72	27,88
Apigenina	38,03	16,44	14,22
Biochanina A	20,76	10,65	15,87
Formononetina	12,07	12,99	7,75
Genisteína	7,06	6,39	3,72
Naringenina	12,28	11,43	2,89
Hesperetina	20,52	10,67	5,67
Taxifolina	30,56	13,96	10,30
Controle	25,70	18,02	13,72

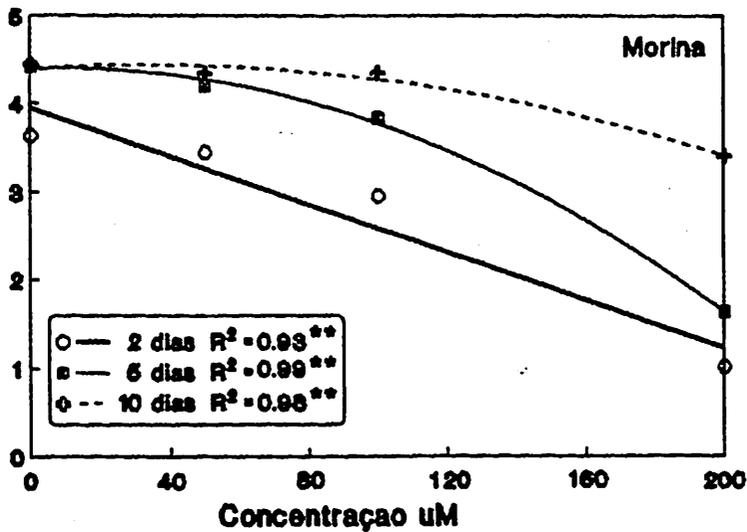
Os diversos flavonóides parecem exercer efeitos sobre a sincronização dos esporos (Tabela 4), conforme se verifica pelos diferentes coeficientes de variação das % de germinação aos 2, 5 e 10 dias. Os compostos genisteína, formononetina, naringenina e quercetina produziram menores coeficientes de germinação quando comparados ao controle, indicando um possível papel na sincronização da germinação.

Dentre os 11 flavonóides testados, 8 mostraram efeitos inibitórios significativos sobre a germinação de *G. gigantea* nas concentrações testadas (Figuras 2 - 5). Os flavonóis mostraram efeitos inibitórios mais pronunciados aos 2 dias de incubação (Figura 2). A fisetina e a quercetina apresentaram resposta

% Germinação $\ln(x+2)$



% Germinação $\ln(x+2)$



% Germinação $\ln(x+2)$

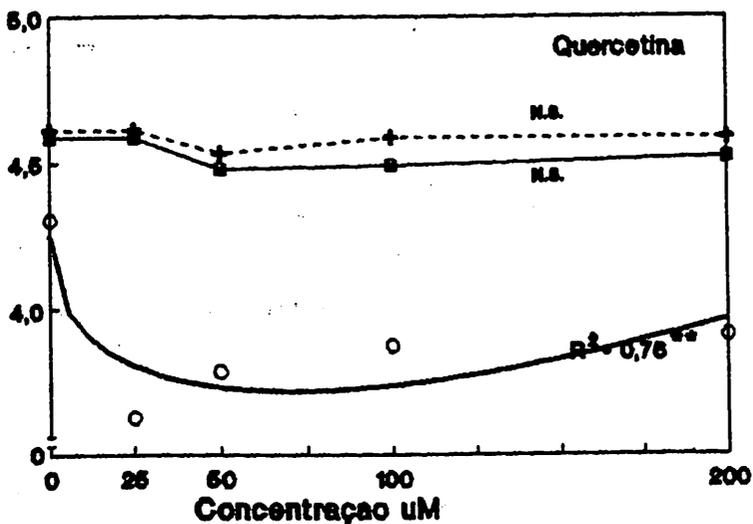


Figura 2. Efeito de flavonóis na germinação de esporos de *G. gigantea* em meio agar-água em diferentes períodos de incubação.

quadrática com elevada atividade inibitória aos 2 dias, reduzindo a porcentagem de germinação em até 97% em relação ao controle. A fisetina se mostrou mais ativa em concentrações de 30 μ M e a quercetina em concentrações de 60 μ M sendo que, aos 5 e 10 dias, verificou-se uma redução do efeito inibitório desses compostos. A morina, aos 2 dias, inibiu linearmente a germinação de esporos até a concentração de 200 μ M (Figura 2), apresentando também, menor atividade aos 5 e 10 dias de incubação.

As flavanonas também apresentaram efeitos inibitórios significativos sobre a germinação dos esporos de *G. gigantea* (Figura 3). A naringenina e a taxifolina reduziram linearmente a germinação de esporos até a concentração de 200 μ M. A taxifolina, no entanto, apresentou elevada atividade apenas aos 2 dias de incubação e atividade inibitória reduzida aos 5 e 10 dias (Figura 3). A hesperetina mostrou também efeitos inibitórios significativos sobre a germinação, com resposta quadrática aos 2 dias de incubação e com inibição máxima na concentração de 252 μ M (Figura 3, Tabela 5). Foi observada ainda, uma queda na atividade inibitória aos 5 e 10 dias de incubação, onde, apesar de não ter sido obtido um ajuste de regressão, verificou-se um efeito inibitório significativo na concentração de 100 μ M(Figura 3). Ao contrário do observado neste estudo, GIANINAZZI-PEARSON et alii (1989) verificaram efeitos estimulatórios da naringenina e hesperetina na germinação de esporos de *G. margarita*. Esses autores, no entanto, trabalharam com concentrações variando entre 0,15 μ M e 1,5 μ M, bem mais baixas que as testadas no presente trabalho. Embora ainda não existam evidências de especificidade dos fungos micorrízicos para compostos fenólicos, os fungos *G.*

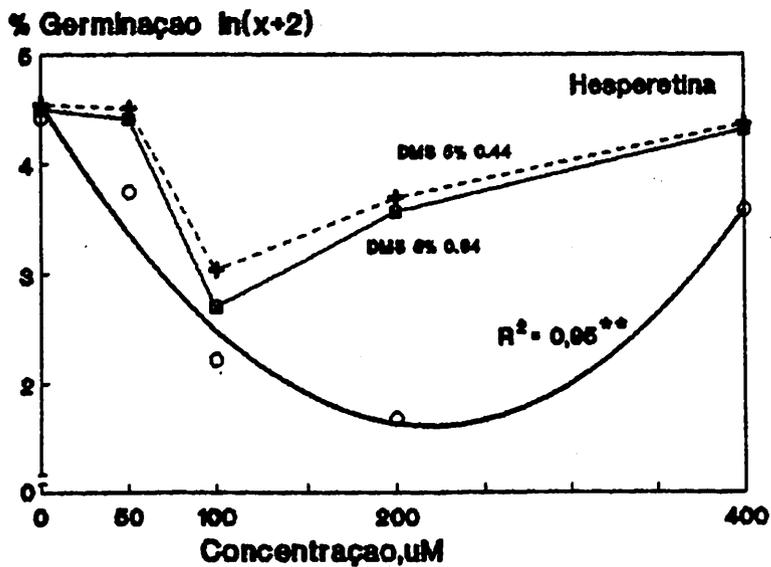
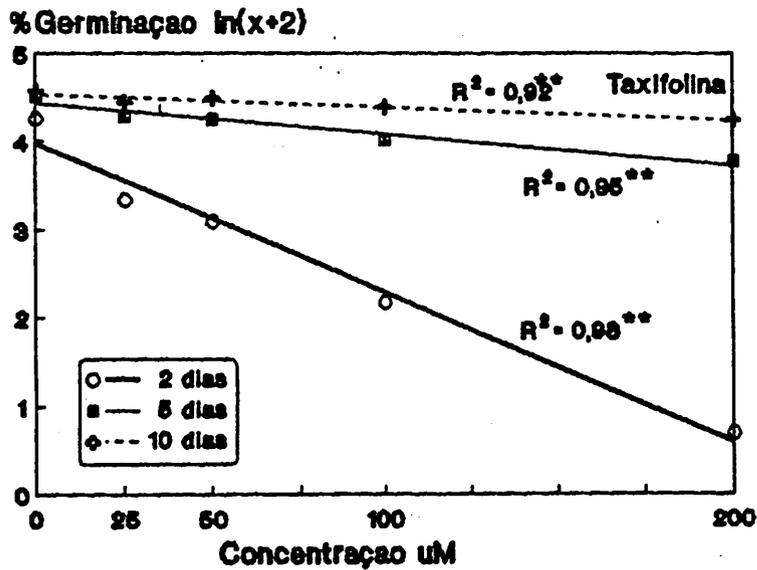
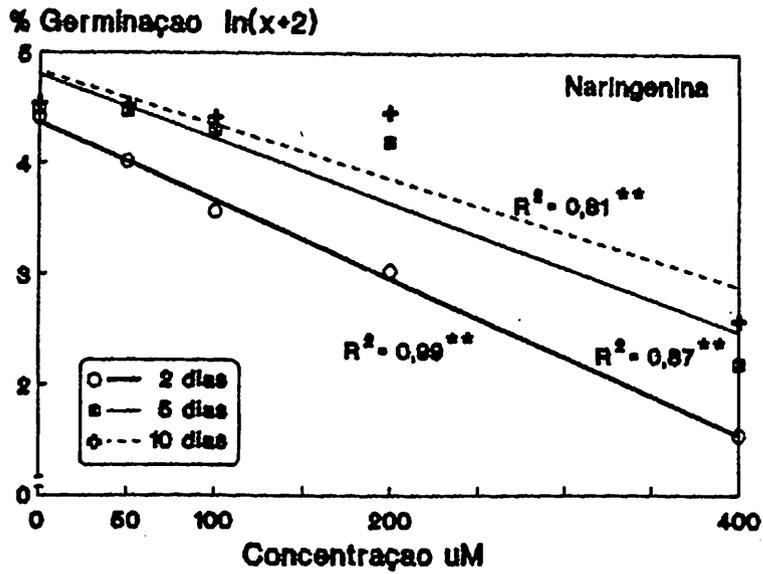


Figura 3. Efeito de flavanonas na germinação de esporos de *G. gigantea* no meio agar-água em diferentes períodos de incubação.

Gigantea e *G. margarita* podem diferir quanto às suas respostas a esses compostos. Verificou-se ainda que a hesperetina, assim como os flavonóis quercetina e fisetina, mostraram uma redução na atividade inibitória em concentrações mais elevadas (Figuras 2 e 3). Esse fato foi também observado por GIANINAZZI-PEARSON et alii (1989) porém não foi explicado. Esse comportamento dos flavonóides poderia ser atribuído a baixa solubilidade desses compostos o que facilitaria sua precipitação e inativação no meio de cultura ou ainda, a absorção e inativação pelos esporos. A redução na disponibilidade dos flavonóides por esses processos reduziria sua atividade no meio de cultura nas maiores concentrações testadas ou em períodos prolongados de incubação, conforme observado aos 5 e 10 dias. Essas possibilidades, no entanto, não foram testadas e seriam necessários experimentos mais específicos para determinar as causas desse comportamento.

Dentre os isoflavonóides testados, apenas a biochanina A apresentou efeitos significativos sobre a germinação dos esporos de *G. gigantea*, reduzindo linearmente a porcentagem de germinação até a concentração de 400 μ M (Figura 4). A genisteína e a formononetina não apresentaram efeitos significativos em nenhuma das épocas estudadas (Figura 4).

Dentre as flavonas testadas, a apigenina não exerceu efeitos significativos, embora tenha apresentado tendências de inibição aos 2 dias de incubação (Figura 5) A flavona apresentou efeitos significativos, reduzindo linearmente a germinação até a concentração de 100 μ M. Verifica-se, no entanto, que não houve redução na atividade inibitória aos 5 e 10 dias de incubação como

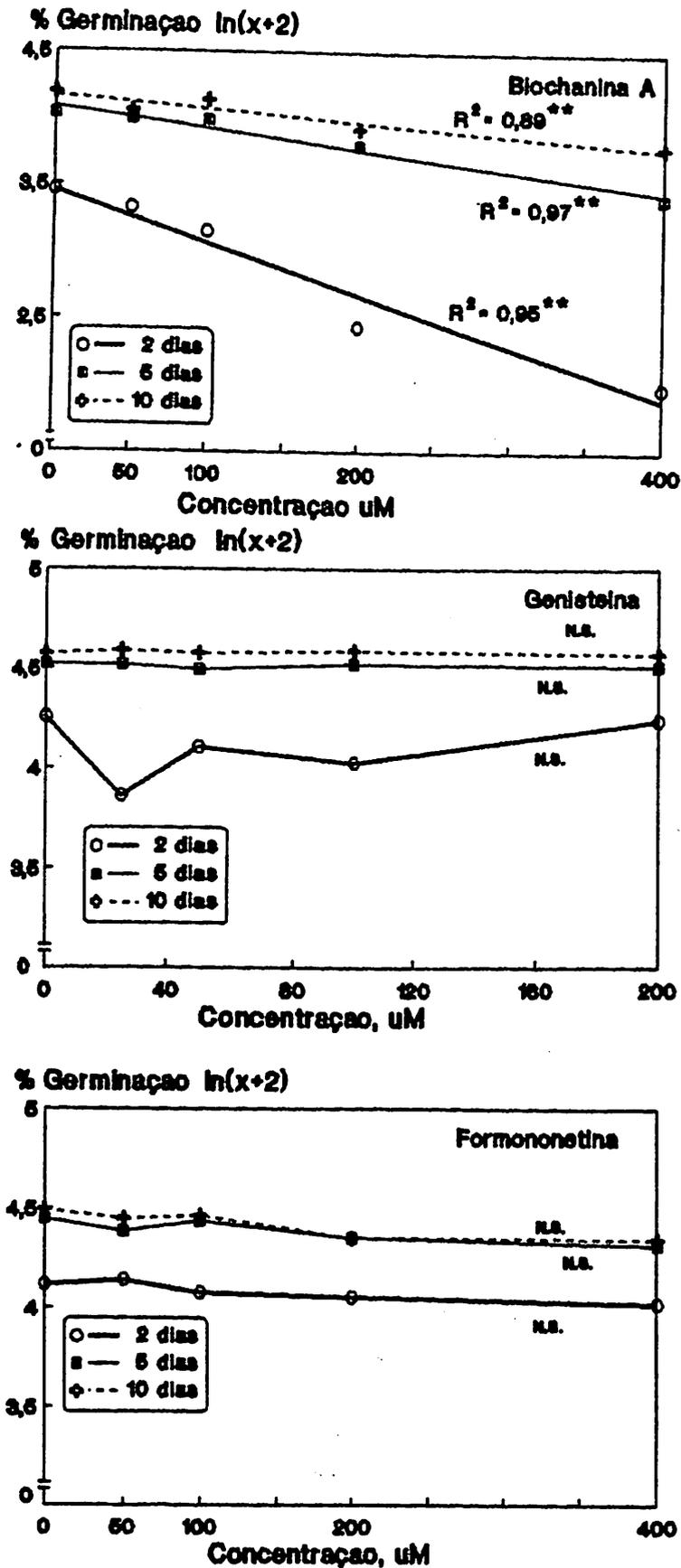


Figura 4. Efeito de isoflavonóides na germinação de esporos de *G. gigantea* no meio agar-água em diferentes períodos de incubação.

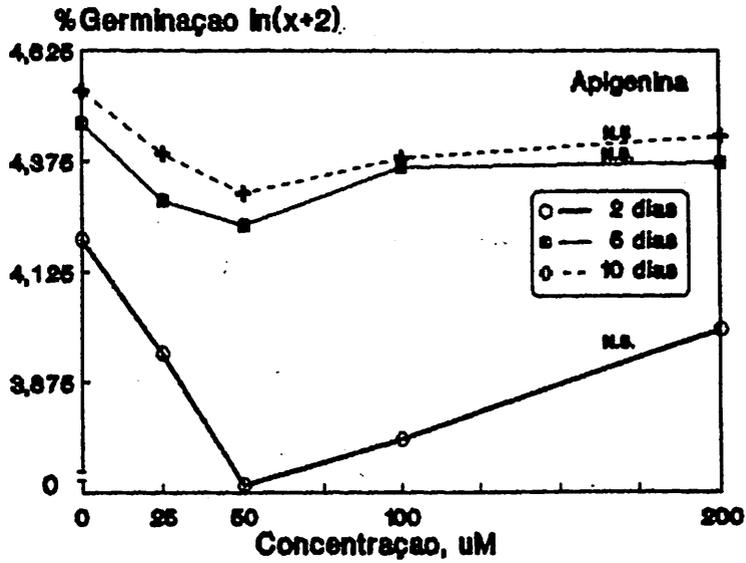
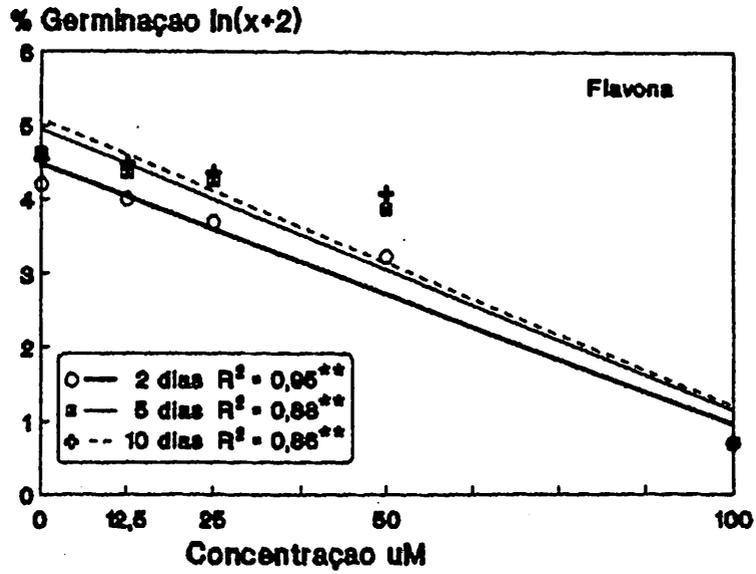


Figura 5. Efeito de flavonas na germinação de esporos de *G.gigantea* no meio agar-água em diferentes períodos de incubação.

observado para os outros flavonóides testados. A flavona parece inviabilizar irreversivelmente os esporos já aos 2 dias de incubação, tornando-os escuros e colapsados. Esses esporos estariam, dessa forma, impossibilitados de germinar nos períodos subsequentes de incubação.

Os efeitos inibitórios observados expressos com porcentagem de inibição máxima em relação ao controle encontram-se resumidos na tabela 5. Verifica-se que a atividade variou com o período de incubação, com a concentração utilizada e com o composto.

Dentre os isoflavonóides testados, verifica-se que a presença de uma hidroxila no grupo R1 do anel A se associa com a atividade inibitória da biochanina A (Figuras 1 e 4). A formononetina, que não apresenta hidroxila neste grupo, não mostrou efeitos significativos sobre a germinação dos esporos de *G.gigantea* (Figura 4). Comparando-se as estruturas da biochanina A e da genisteína, verifica-se que a presença de uma metilação no grupo R2 do anel B se relacionou com a maior atividade da biochanina A (Figuras 1 e 4). Aparentemente a presença de uma hidroxila na posição R1 deve estar associada a presença de um grupo metil na posição R2 para atividade inibitória, uma vez que a ausência da hidroxila (formononetina) ou a ausência do grupo metil (genisteína) elimina a atividade inibitória desses compostos nas concentrações testadas. Em rizóbio, a metilação no grupo R2 (Figura 1) foi identificada como responsável pela atividade inibitória dos isoflavonóides sobre os gens Nod de *Bradyrhizobium japonicum* (KOSSLAK et alii, 1987) e a presença de uma hidroxila

Tabela 5: Porcentagem de inibição em relação ao controle e concentração inibitória máxima dos flavonóides sobre a germinação de *G. gigantea*.

Composto	2 Dias		5 Dias		10 Dias	
	Conc.(uM)	%Inib.	Conc.(uM)	%Inib.	Conc.(uM)	%Inib.
Fisetina	30	67	34	13	36	5
Morina	275	72	388	63	850	23
Quercetina	60	16	N.S.	-	N.S.	-
Hesperetina	252	62	*100	39	*100	32
Naringenina	LN-200	65	LN-200	51	LN-200	43
Taxifolina	LN-200	84	LN-200	17	LN-200	7
Formonon.	N.S.	-	N.S.	-	N.S.	-
Biochanina	LN-400	42	LN-400	15	LN-400	9
Genisteína	N.S.	-	N.S.	-	N.S.	-
Apigenina	N.S.	-	N.S.	-	N.S.	-
Flavona	LN-100	83	LN-100	85	LN-100	85

Obs. N.S. - Efeito não significativo

LN - Resposta linear

* - Efeito significativo, sem ajuste de regressão

nesta posição confere atividade indutora a genisteína e daidzeína sobre os gens Nod de *Rhizobium meliloti* e *R. leguminosarum* (ZAAT et alii, 1987; ROLFE, 1988). Aparentemente os padrões de metilação e hidroxilação dos anéis A e B são importantes na determinação da atividade dos isoflavonóides sobre os fungos micorrizicos de forma semelhante ao observado em rizóbio. WEIDENBORNER et alii (1990), estudando a ação antifúngica de flavonóides sobre *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfisii* verificaram que o grau de redução, a posição e o nº de

grupos hidroxila, constituem parâmetros importantes para a alta atividade destas substâncias. O padrão de substituição com dois grupos hidroxila C5 e C7 e um grupo metoxi C4 foram necessários para uma elevada atividade antifúngica. Aparentemente, a presença de um grupo metoxi contribui para a permeabilidade dos flavonóides na membrana celular e para a estabilidade dos compostos contra a degradação fúngica (WEIDENBORNER et alii, 1989; ADESANYA et alii, 1986).

Comparando-se as flavanonas com as flavonas testadas, verifica-se que a presença da ligação dupla C2-C3 na apigenina associou-se a uma menor atividade inibitória comparada à naringenina, de estrutura semelhante (Figura 1).

Em adição à sua atividade inibitória sobre a germinação dos esporos de *G. gigantea*, vários compostos fenólicos apresentaram efeitos também sobre a morfologia da hifa fúngica recém formada. Em observações microscópicas feitas aos 5 dias de incubação, verificou-se que a biochanina e a flavona inibiram fortemente o crescimento inicial do tubo germinativo, produzindo hifas curtas e pouco ramificadas. A taxifolina também afetou o desenvolvimento inicial do tubo germinativo produzindo hifas curtas e com grande profusão de regiões de extrusão citoplasmática. Conforme mencionado por SIQUEIRA (1983), a extrusão citoplasmática resulta do desbalanço da atividade entre enzimas responsáveis pela síntese e degradação da parede celular na ponta da hifa. A naringenina e hesperetina induziram um crescimento esparço e com poucas ramificações quando comparadas ao controle. Dentre os flavonóis, verificou-se que a

morina e a quercetina induziram um maior crescimento inicial das hifas que se apresentaram mais longas, com poucas ramificações e com as extremidades sinuosas. GIANINAZZI-PEARSON (1989) não verificou qualquer efeito da naringenina e hesperetina sobre a morfologia das hifas de *G. margarita*, no entanto, foram testadas concentrações mais baixas (0 - 1,5 μ M). O efeito dos flavonóides na morfologia da hifa fúngica foi, aparentemente dependente do composto e estudos bioquímicos adicionais são necessários para esclarecer sua ação sobre os fungos micorrízicos, principalmente sobre a estrutura da parede celular fúngica, a qual determina a morfologia da hifa e conseqüentemente influencia sua capacidade de colonizar a raiz.

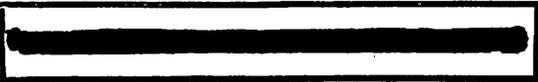
Conforme observado no presente trabalho, os diversos flavonóides variaram quanto a sua atividade sobre a germinação de esporos de *G. gigantea* nas concentrações testadas. Os compostos foram inibitórios ou não apresentaram efeitos sobre a germinação (Tabela 5). A atividade inibitória esteve associada à determinadas características químicas, tais como, a presença de uma hidroxila na posição 5 associada a uma metilação na posição 4 nos isoflavonóides e à ausência da ligação dupla C2-C3 nas flavonas.

Vários estudos têm demonstrado a atividade antifúngica dos flavonóides, destacando-se os isoflavonóides como importantes fitoalexinas vegetais (VANETTEN, 1976; KRAMER et alii, 1984; STOSSEL, 1985; ADESANYA, 1986; SINGH et alii, 1988; WEIDENBORNER et alii, 1989, 1990). A ação inibitória destes compostos sobre a germinação de fungos MVA, foi observada por TSAI & PHILLIPS (1991), que verificou a inibição da germinação de *Glomus*

etunicatum e *Glomus macrocarpum* pela formononetina na concentração de 2,5 μ M. Outros estudos, no entanto, não verificaram efeitos inibitórios de vários flavonóides sobre a germinação de esporos de fungos MVA (GIANINAZZI-PEARSON et alii, 1989; MORANDI et alii, 1992) quando testados em concentrações de 1-10 μ M. O efeito de concentrações mais elevadas de flavonóides (acima de 1000 μ M) sobre a germinação de esporos de fungos MVA, no entanto, é de grande importância ecológica uma vez que, no solo, em algumas circunstâncias, esses compostos podem alcançar concentrações de 100-1000 μ M (SIQUEIRA et alii, 1991a) e exercer atividade deletéria sobre a simbiose micorrízica reduzindo as taxas de colonização da raiz em virtude da inibição da germinação dos esporos fúngicos. Portanto, embora em alguns casos os compostos fenólicos liberados pelos sistemas radiculares possam exercer uma ação protetora contra patógenos, estes podem também inibir a germinação de esporos de fungos MVA, configurando um efeito alelopático direto sobre o fungo e indireto sobre a planta.

4.2 Crescimento micelial

Dos 14 flavonóides testados apenas 5 não apresentaram efeitos significativos sobre o crescimento micelial de *G. gigantea* (Tabelas 6 e 5A-8A). Todos os outros foram estimulantes, com exceção da biochanina A que inibiu linearmente o crescimento micelial até a concentração de 10 μ M (Figuras 6 a 9).



Dentre os flavonóis testados, a fisetina, morina e quercetina exibiram uma resposta quadrática ao crescimento micelial (Figura 6). Sendo que a concentração de maior estímulo em relação ao controle foi de 3,98 μ M ; 4,10 μ M e 19 μ M para a fisetina, morina e quercetina respectivamente. Os outros flavonóis testados: myricetina e kaempferol, mostraram comportamento irregular sobre o crescimento micelial e, embora não tenha sido obtido um ajuste das respostas, verificou-se um estímulo significativo, com maior resposta em concentrações de 5 μ M dos 2 compostos. Os maiores estímulos ao crescimento micelial foram obtidos com a morina e a quercetina e os menores com a myricetina e o kaempferol. Os flavonóis estimularam também significativamente a produção de células auxiliares que apresentaram resposta quadrática às diversas concentrações (Figuras 6 a 9, Tabela 9A). Apenas a morina não afetou significativamente a produção de células auxiliares de *G. gigantea*, embora tenha se observado um estímulo (28%) na concentração de 1 μ M (Figura 6). O composto mais estimulante foi a fisetina na concentração de 3,98 μ M (Figura 6), produzindo um aumento com relação ao controle de 187%. TSAI & PHILLIPS (1991) observaram, também, um efeito estimulante do flavonol quercetina sobre o crescimento micelial de *G. etunicatum* na concentração de 2,5 μ M. MORANDI et alii (1992), no entanto, não observaram efeitos da quercetina, nas concentrações de 0,1-10 μ M, sobre o crescimento

Tabela 6. Resumo das análises de variância e regressão do crescimento micelial e produção de células auxiliares de *G. gigantea* em meio líquido suplementado com flavonóides. Dados transformados por $\sqrt{(x+0.5)}$. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Composto		Anava		Equação	r^2	Nível de significância da regressão
		Quadrado Médio	Nível de Significância			
Genisteína	CM	0,8267149	0,28243	-	-	-
	CA	0,0399266	0,30313	-	-	-
Daidzeína	CM	0,8411236	0,11133	-	-	-
	CA	0,1657489	0,17153	-	-	-
Formonon.	CM	1,8393903	0,01328	Sem ajuste	-	-
	CA	0,3974489	0,00023	Sem ajuste	-	-
Biochan.A	CM	10,2181266	0,00033	$Y=8,12017-3,9388X$	0,9959	0,00009
	CA	0,7982024	0,00117	$Y=1,71350-1,0658X$	0,9335	0,00029
Hesperetina	CM	2,4981797	0,04371	$Y=8,3146-5,5221X-6,2645X^2$	0,9861	0,01538
	CA	0,3385285	0,14736	-	-	-
Taxifolina	CM	3,0926210	0,11042	-	-	-
	CA	1,4728240	0,00034	$Y=1,0464+4,9277X-4,8731X^2$	0,7485	0,00016
Naringenina	CM	3,3170696	0,00458	$Y=8,3399+2,7645X-4,4601X^2$	0,9762	0,01895
	CA	0,4029713	0,02351	$Y=1,5815+2,1399X-2,4424X^2$	0,9461	0,00098
Flavona	CM	2,4047925	0,13637	-	-	-
	CA	1,4208852	0,00360	$Y=1,3005+5,6073X-5,5219X^2$	0,9928	0,00069
Apigenina	CM	2,2573036	0,13010	-	-	-
	CA	0,6929755	0,03823	$Y=1,4026+1,6282X-2,2891X^2$	0,8870	0,05928
Quercetina	CM	3,7421465	0,00334	$Y=6,4850+4,3044X-2,4937X^2$	0,8370	0,00098
	CA	0,2188295	0,00396	$Y=1,2225+0,5937X-0,4963X^2$	0,9625	0,00302
Myricetina	CM	1,0315674	0,03264	Sem ajuste	-	-
	CA	0,3668961	0,00994	$Y=1,8384+2,5760X-2,691X^2$	0,9969	0,00216
Morina	CM	4,4098456	0,02543	$Y=6,8574+9,5956X-9,6515X^2$	0,9988	0,00448
	CA	0,0724117	0,36941	-	-	-
Kaempferol	CM	2,5506560	0,00160	Sem ajuste	-	-
	CA	0,8928670	0,03982	$Y=1,7576+2,1885X-2,8571X^2$	0,8739	0,04349
Fisetina	CM	4,8866998	0,00095	$Y=7,6892+8,4471X-9,1801X^2$	0,9566	0,00035
	CA	2,0392382	0,00003	$Y=1,0618+5,2025X-5,5229X^2$	0,7824	0,00002

Obs. CM Crescimento micelial
CA Células auxiliares

micelial de *G. margarita*. As diferenças de resposta observadas nestes estudos indicam uma variabilidade das várias espécies de fungos MVA, ou ainda, uma influência dos diversos meios de cultura e condições de cultivo sobre o crescimento micelial dos fungos micorrízicos e sobre a resposta aos diversos flavonóides. Em experimentos realizados com *G. margarita*, BECARD et alii (1992) e CHABOT et alii (1992), verificaram, ao contrário do observado por MORANDI et alii (1992), um efeito estimulante dos flavonóides quercetina, myricetina e morina sobre o crescimento micelial deste fungo na concentração de 10 μ M. Contudo, foram utilizados nestes experimentos meios de cultura e condições de cultivo diferentes. Além do efeito estimulante sobre o crescimento micelial, foi verificado também estímulo na produção de células auxiliares pela myricetina e quercetina e a inibição pelo kaempferol. No presente trabalho o kaempferol mostrou-se inibitório na produção de células auxiliares de *G. gigantea* na concentração de 10 μ M (Figura 6) e a myricetina não apresentou efeitos significativos sobre o crescimento micelial e a produção de células auxiliares. Apenas a quercetina mostrou estímulo sobre o crescimento micelial e a produção de células auxiliares nas concentrações em torno de 10 μ M (Figura 6). Neste estudo, os flavonóis mostraram efeito estimulante em concentrações menores, em torno de 4 a 5 μ M, com exceção da quercetina que se mostrou ativa em concentrações maiores, em torno de 19 μ M. As diferenças nos resultados observados em relação aos trabalhos anteriores possivelmente são devidas,

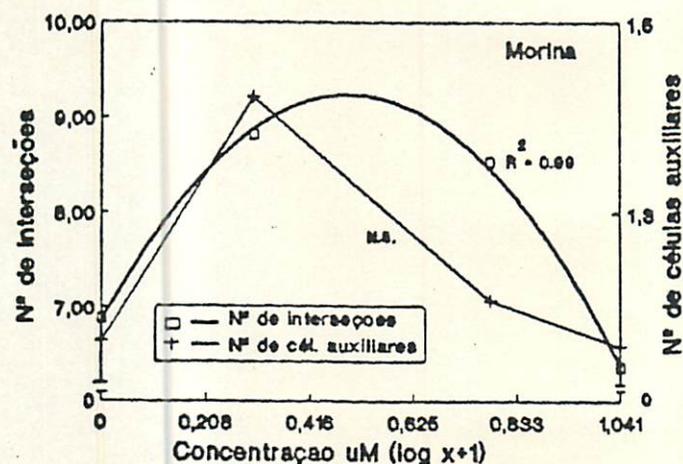
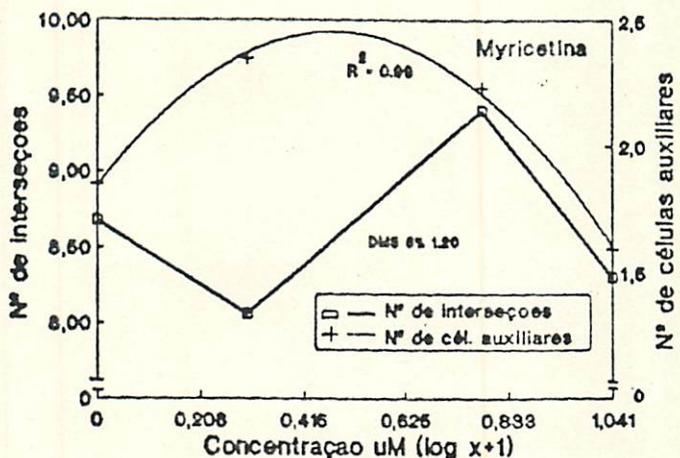
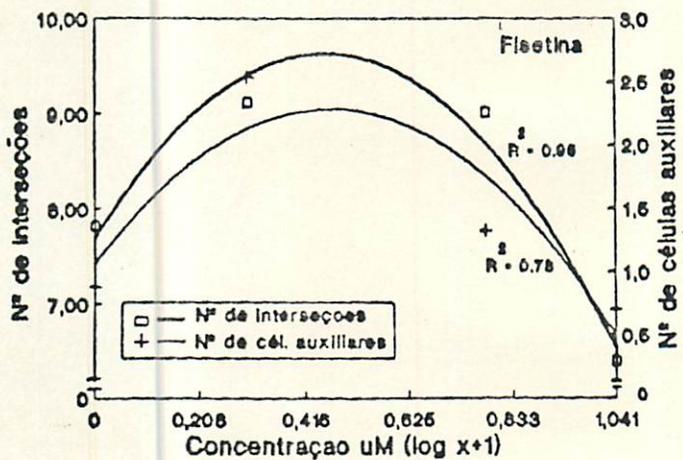
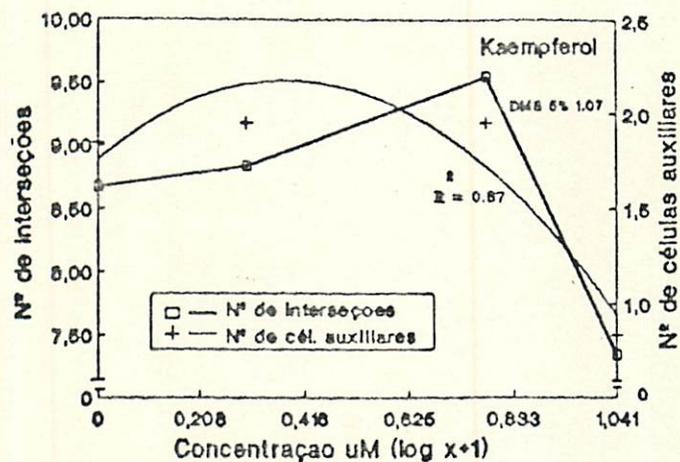
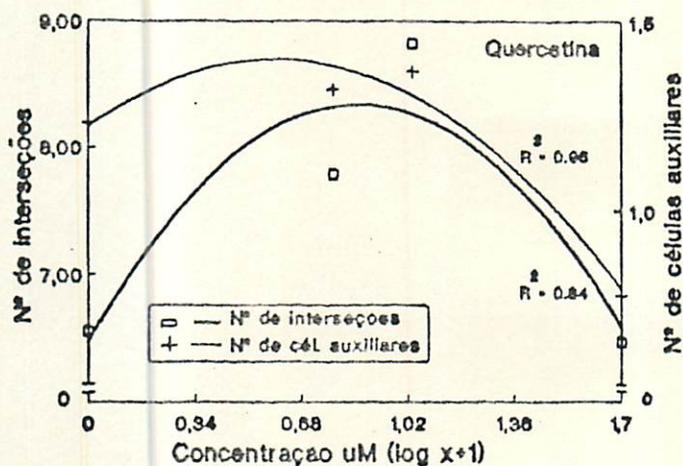


Figura 6. Efeito de flavonóis sobre o crescimento micelial e produção de células auxiliares de *G. gigantea* em meio líquido

também, às diferentes condições de cultivo e meios de cultura e/ou a uma tendência de resposta diferenciada das várias espécies de fungos micorrizicos aos flavonóides.

Dentre as flavanonas testadas, a hesperetina e a naringenina apresentaram efeitos estimulantes significativos sobre o crescimento micelial de *G. gigantea* (Figura 7). A resposta às duas flavanonas foi quadrática, com maior estímulo nas concentrações de 1,9 μ M e 2,2 μ M para a hesperetina e naringenina respectivamente. A hesperetina apresentou o maior estímulo sobre o crescimento micelial mas não apresentou efeitos significativos sobre a produção de células auxiliares. A taxifolina, embora não tenha apresentado efeitos significativos, mostrou estímulo quando na concentração de 1 μ M. A naringenina e a taxifolina apresentaram estímulos significativos sobre a produção de células auxiliares sendo que, a taxifolina apresentou o maior estímulo. Esses resultados corroboram aqueles observados por GIANINAZZI-PEARSON et alii (1989), que verificaram efeitos estimulatórios da naringenina e hesperetina sobre o crescimento micelial de *G. margarita* na concentração de 1,5 μ M. O mesmo estímulo não foi observado nos trabalhos de BECARD et alii (1992) e CHABOT et alii (1992) que encontraram ausência de efeito ou inibição pelas flavonas hesperetina e naringenina a 10 μ M no crescimento de *G. margarita*. Nessa concentração, foi verificado também no presente trabalho,

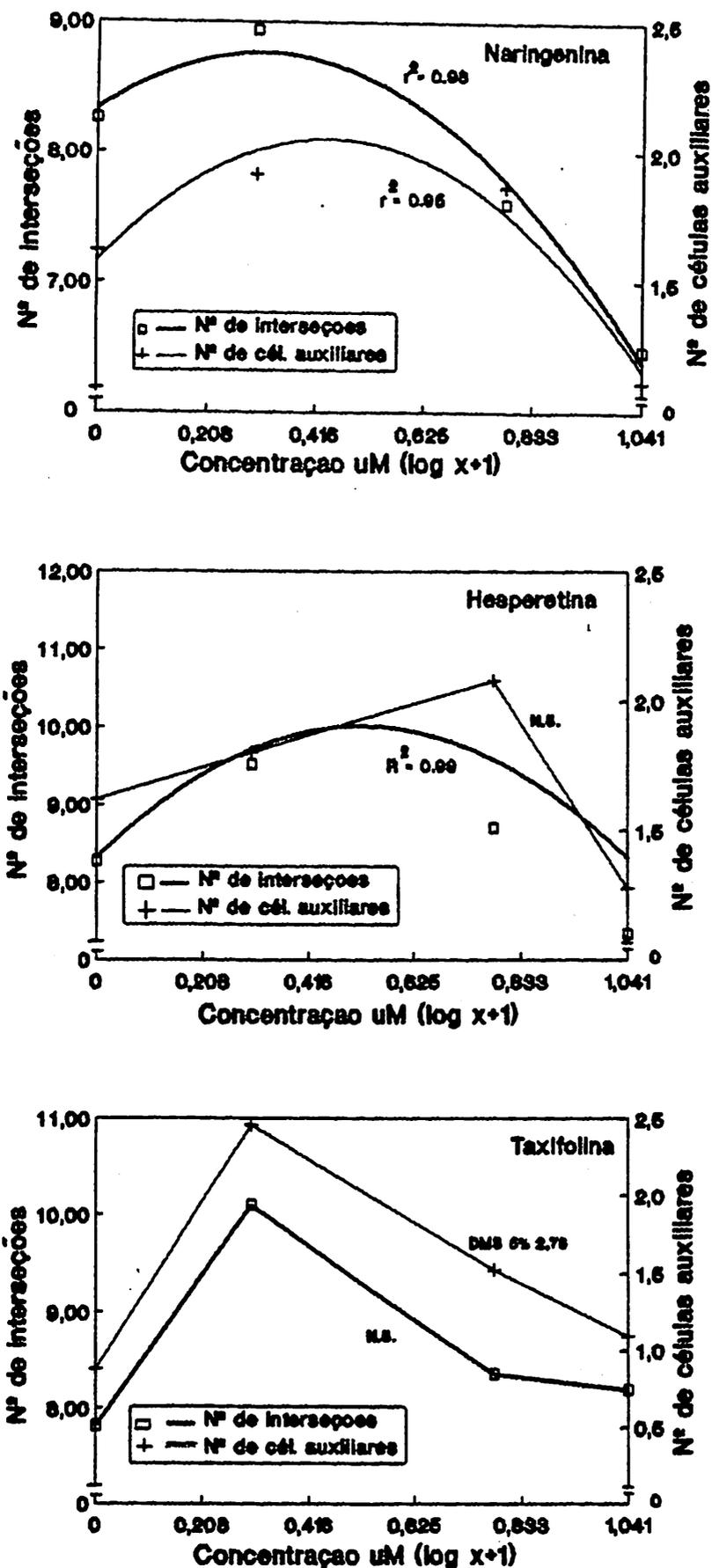


Figura 7. Efeito de flavanonas no crescimento micelial e produção de células auxiliares de *G. gigantea* em meio líquido.

uma queda na atividade da hesperetina que não mostrou efeitos significativos. Esses compostos apresentam efeitos estimulantes significativos apenas em concentrações muito baixas de cerca de 1µM. A produção de células auxiliares apresentou resposta semelhante à do crescimento micelial (Figura 7). A hesperetina não apresentou efeitos significativos sobre a produção de células auxiliares, já a naringenina e a taxifolina estimularam a produção de células auxiliares nas concentrações de 4µM e 1µM respectivamente. BECARD et alii (1992) não observaram efeitos significativos da naringenina e da hesperetina sobre a produção de células auxiliares de *G. margarita* na concentração de 10µM. No presente trabalho, no entanto, nesta concentração, a naringenina mostrou tendências de inibição da produção de células auxiliares enquanto a hesperetina não mostrou efeitos significativos (Figura 7).

Dentre os isoflavonóides testados, apenas a biochanina A e a formononetina apresentaram efeitos significativos sobre o crescimento micelial de *G. gigantea* (Figura 8). A biochanina A inibiu linearmente o crescimento micelial e a produção de células auxiliares até a concentração de 10µM, enquanto a formononetina estimulou o crescimento significativamente. Embora não tenha sido obtido um ajuste de regressão, as respostas à formononetina foram maiores nas concentrações de 0,25 µM - 2,5 µM e 0,25 µM - 0,5 µM para o crescimento micelial e produção de células auxiliares respectivamente. A genisteína e a

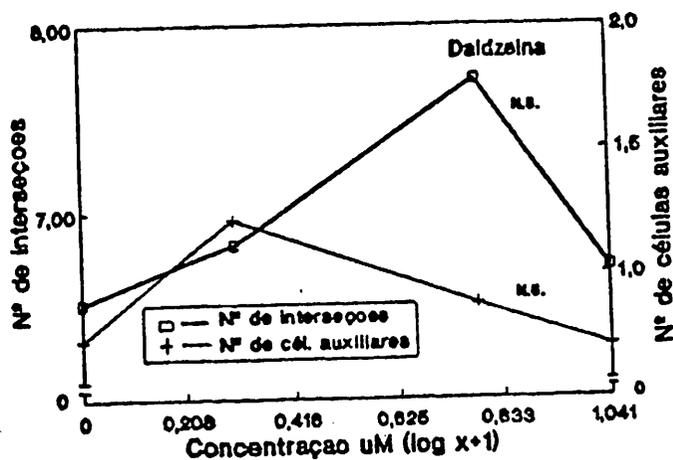
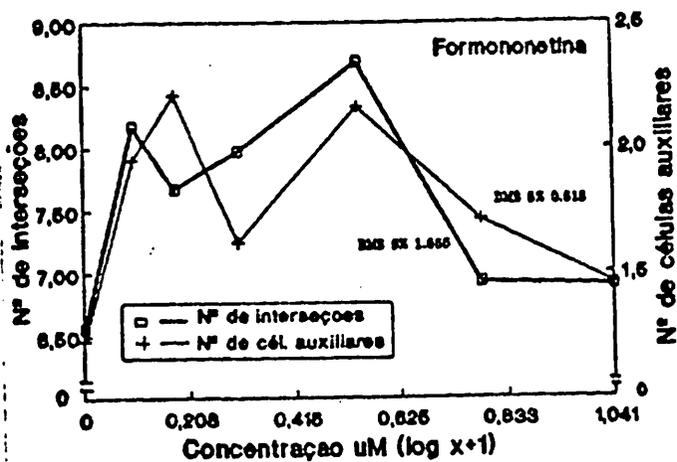
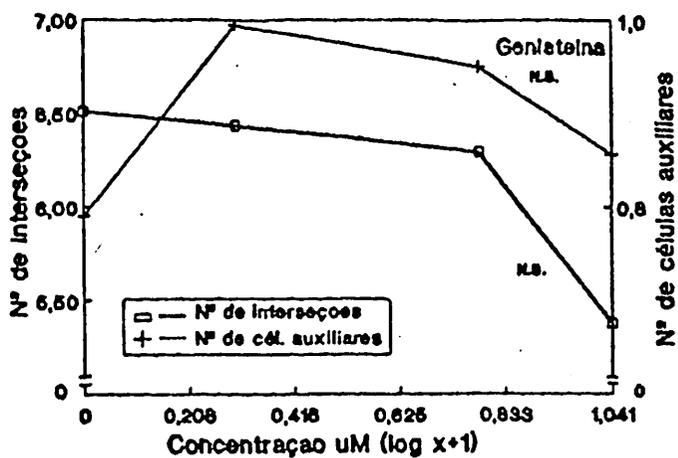
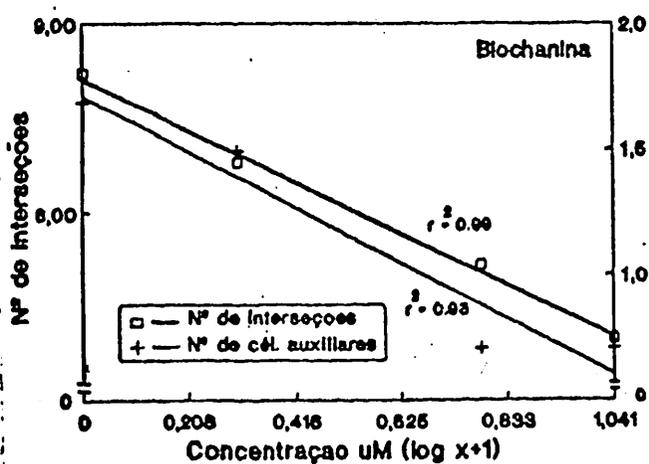


Figura 8. Efeito de isoflavonóides no crescimento micelial e produção de células auxiliares de *G.gigantea* em meio líquido.

daidzeína não influenciaram significativamente o crescimento micelial e a produção de células auxiliares (Figura 8), embora tenha se verificado uma tendência à inibição do crescimento micelial pela genisteína a 10 μM (Figura 8). BECARD et alii (1992) e CHABOT et alii (1992) observaram, de forma semelhante, forte inibição do crescimento micelial e da produção de células auxiliares de *G. margarita* pela biochanina A na concentração de 10 μM . CHABOT et alii (1992), no entanto, observaram efeitos inibitórios significativos da genisteína sobre o crescimento micelial de *G. margarita* na concentração de 10 μM .

A flavona e apigenina não apresentaram efeitos significativos sobre o crescimento micelial de *G. gigantea* (Figura 9), mas ambas estimularam significativamente a produção de células auxiliares em concentrações de 4,5 μM e 3,2 μM respectivamente (Figura 9). BECARD et alii (1992), no entanto, verificaram uma forte inibição do crescimento micelial e produção de células auxiliares de *G. margarita* por flavona e apigenina a 10 μM . No presente trabalho, apesar de não se ter obtido um resultado significativo, verificou-se também uma tendência à inibição do crescimento micelial pela flavona e apigenina em concentrações de 10 μM (Figura 9) e tendência a inibição da produção de células auxiliares pela apigenina a 10 μM . GIANINAZZI-PEARSON et alii (1989) verificaram um estímulo significativo da apigenina sobre o crescimento micelial de *Glomus* sp quando em concentrações de 0,15 μM . Neste trabalho, embora uma pequena tendência a estímulo tenha sido observada na concentração de 1 μM de apigenina (Figura 9), os resultados não foram significativos e concentrações menores não foram

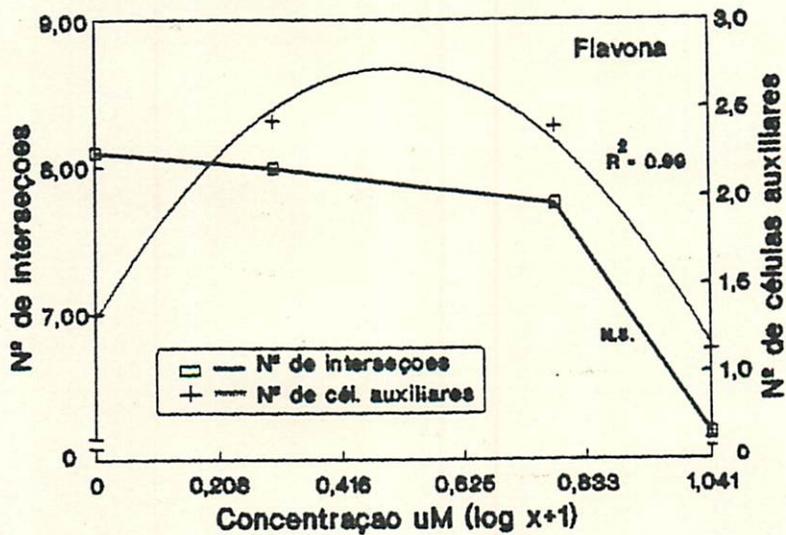
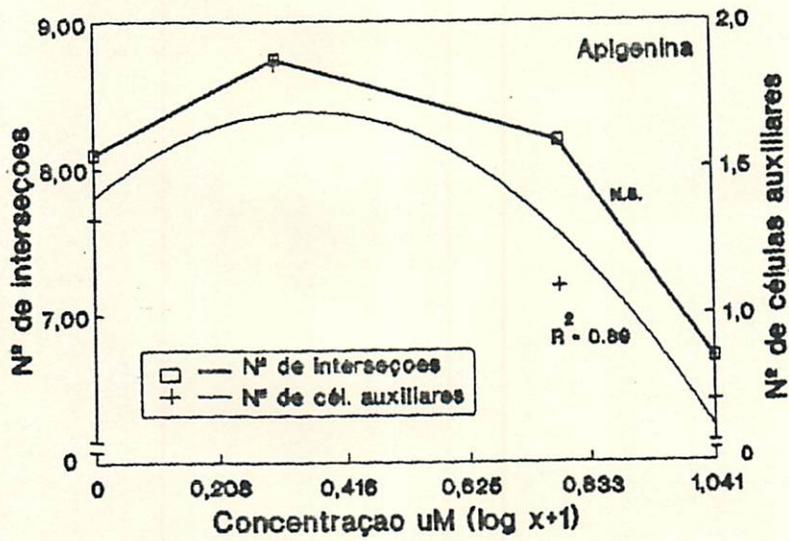


Figura 9. Efeito de flavonas no crescimento micelial e produção de células auxiliares de *G. gigantea* em meio líquido.

testadas. A grande facilidade de crescimento "in vitro" de *G. gigantea* pode torna-la uma espécie pouco sensível a estímulos de compostos menos ativos e, por outro lado, existe a possibilidade de uma resposta diferencial de certas espécies fúngicas aos flavonóides.

Foi observado que os diversos flavonóides testados variaram quanto a sua atividade sobre o crescimento micelial e produção de células auxiliares de *G. gigantea* (Tabela 7). A magnitude de estímulo ou inibição foi dependente da concentração, e do composto. Comparando-se os diversos flavonóides verifica-se que determinadas características estruturais associam-se a seus efeitos sobre o fungo. Dentre os flavonóis estudados, os compostos com menor atividade estimulante e que apresentaram uma resposta inconsistente em função da concentração, a myricetina e kaempferol (Figura 6), são os únicos a possuir hidroxilas nas posições R1 e R2 dos anéis A e C (Figura 1). Todos os outros flavonóis testados apresentam hidroxilas em apenas uma dessas posições, o que pode estar associado à resposta quadrática da morina, fisetina e quercetina.

Comparando-se, as estruturas da naringenina e apigenina (Figura 1), onde a única diferença é a insaturação na posição C2-C3 na naringenina, conclui-se que a ausência dessa ligação se associa a atividade estimulatória da naringenina em contraste com a ausência de efeitos significativos da apigenina. BECARD et alii (1992) e CHABOT et alii (1992) discutem a necessidade da ligação dupla C2-C3 no anel C para a atividade estimulatória dos flavonóides sobre o crescimento micelial de

Tabela 7: Porcentagem de estímulo (+) ou inibição (-) do crescimento micelial de *G. gigantea* em relação ao controle e concentração mais ativa dos flavonóides.

Composto	Crescimento Micelial		Cel. Auxiliares	
	Conc. (uM)	%	Conc. (uM)	%
Fisetina	3,98	+17	3,80	+187
Morina	4,10	+28	N.S.	-
Myricetina	*5,0	+9	3,75	+27
Kaempferol	*5,0	+10	3,58	+6
Quercetina	18,99	+34	5,07	+11
Hesperetina	1,99	+15	N.S.	-
Naringenina	2,21	+8	3,72	+18
Taxifolina	N.S.	-	*1	+179
Biochanina	LN-10	-51	LN-10	-58
Formonon.	*0,25-2,5	+32	*0,5-2,5	+79
Daidzeína	N.S.	-	N.S.	-
Genisteína	N.S.	-	N.S.	-
Flavona	N.S.	-	4,50	+83
Apigenina	N.S.	-	3,21	+40

Obs. N.S. - Efeito não significativo

LN - Resposta linear

* - Efeito significativo, sem ajuste de regressão

G. margarita, uma vez que, esses autores não encontraram efeitos estimulantes desses compostos em concentrações de 10uM. No entanto, conforme verificado no presente trabalho, esses compostos são ativos em concentrações muito baixas estando essa característica, possivelmente relacionada à ausência da ligação dupla C2-C3.

Dentre os isoflavonóides testados, verifica-se que a presença de uma hidroxila na posição 5, associada a uma metilação na posição 4 relacionou-se à atividade inibitória da biochanina A. Por outro lado, a ausência do grupo OH na posição 5 associada à metilação da posição 4 relacionou-se com a atividade estimulatória da formononetina. A ausência da metilação na posição 4 (genisteína e daidzeína) foi característica comum dos isoflavonóides sem efeito significativo sobre o crescimento micelial de *G. gigantea*.

Embora tenham ocorrido variações no pH do meio líquido após a incubação (Tabela 11A) estas não se relacionaram com o crescimento micelial ($R=0,34$; $P < 0,05$). Verificou-se ainda que o crescimento micelial de *G. gigantea* não foi influenciado pelo pH do meio nutritivo quando este variou de 4,5 a 6,0 (Tabela 12A). Este fato descarta o possível efeito dos flavonóides via alteração do pH do meio.

Com base na magnitude de efeitos dos diversos flavonóides sobre o crescimento micelial de *G. gigantea* (Tabela 7), foram escolhidos 2 isoflavonóides de maior atividade estimulatória para verificação dos seus efeitos sobre o crescimento micelial de esporos pré-germinados de *G. clarum*. Foram testados o isoflavonóide formononetina e o flavonol quercetina em concentrações variando de 0,5 a 50 μ M. Verificou-se que os dois flavonóides apresentaram efeitos estimulantes significativos sobre o crescimento micelial de *G. clarum* ($P > 0,01$; Tabela 10A). A quercetina foi o composto mais estimulante, aumentando o crescimento micelial em até 220% com relação ao

controle e apresentando resposta linear até 50 μ M. A formononetina apresentou estímulo de até 114% na concentração de 0,5 μ M, não sendo obtido um ajuste de regressão para os pontos (Figura 10). A espécie MVA *G. clarum* foi muito mais sensível à atividade estimulante dos flavonóides, possivelmente devido a menor intensidade de seu crescimento "in vitro" quando comparada a *G. gigantea*. Essa característica a torna mais sensível à ação estimulante dos flavonóides levando-a a apresentar maiores respostas em meio de cultura.

Conforme observado no presente trabalho, a atividade dos flavonóides sobre o crescimento micelial dos fungos MVA é dependente do composto, da concentração utilizada e da espécie fúngica testada (Tabela 7). Verificou-se que os grupos de flavonóides testados apresentaram, nos diversos experimentos, uma tendência a maior atividade em determinadas concentrações. Enquanto as flavanonas foram mais ativas em concentrações em torno de 1 μ M a 2 μ M, os flavonóis foram mais ativos em concentrações de 4 μ M a 19 μ M. Os maiores estímulos no crescimento micelial de *G. gigantea* foram obtidos com a formononetina (32%) e a quercetina (34%), enquanto os mesmos compostos induziram respostas em *G. clarum* da ordem de 220% a 114% para a quercetina e formononetina respectivamente. A presença de diversos grupamentos hidroxila no anel B (Figura 1), conforme se observa ao comparar-se as estruturas dos flavonóis (estimulantes) e das

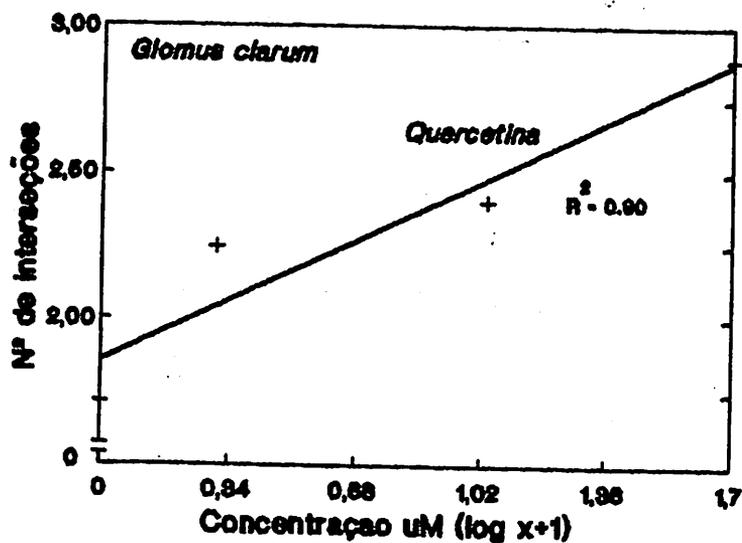
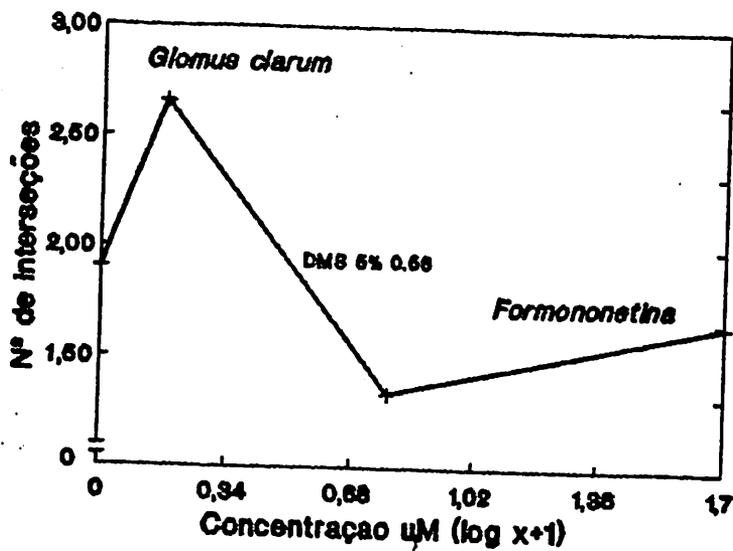


Figura 10. Efeito de formononetina e quercetina sobre o crescimento micelial de *G. clarum* em meio líquido.

flavonas (sem atividade), assim como a presença de metilações em grupos determinados conforme se observa na hesperetina, formononetina e biochanina A parece relacionar-se à atividade desses compostos como observado anteriormente por BECARD et alii (1992) e CHABOT et alii (1992). Nos isoflavonóides, a presença de um radical metil na posição R2 associado a uma hidroxila na posição R1 relacionou-se com a atividade inibitória, enquanto a ausência da hidroxila na posição R1 associada à mesma metilação na posição R2 relacionou-se com a atividade estimulante (Figura 1). A posição dos grupamentos hidroxila no anel B das flavanonas e flavonóis e a ausência de ligação dupla no anel C das flavanonas associa-se à atividade estimulante desses compostos, sendo que, as flavanonas foram ativas em concentrações mais baixas, em torno de 1 a 2 μ M (Figura 1, Tabela 7). As flavonas, com pequeno número de grupamentos hidroxila no anel B, se comparadas aos flavonóis, não apresentaram efeitos significativos sobre o crescimento micelial, embora tenham se mostrado estimulantes sobre a produção de células auxiliares.

O efeito estimulante ou inibitório dos flavonóides sobre o crescimento micelial e produção de células auxiliares de *G. gigantea* e o elevado estímulo observado sobre o crescimento micelial de *G. clarum* aumentam as evidências da importância desses compostos para os fungos micorrízicos. Os flavonóides comumente liberados pelo sistema radicular das plantas em concentrações em torno de 5 μ M (GRAHAM, 1991), semelhantes às testadas neste trabalho, podem interferir na capacidade destes fungos de colonizar as raízes através do estímulo ou

inibição do crescimento inicial da hifa fúngica na rizosfera. No entanto, o mecanismo de ação destes compostos é ainda desconhecido, sendo necessários estudos adicionais. Os resultados aqui relatados sugerem que esses compostos podem atuar como sinais moleculares ou mediadores nutricionais para o crescimento inicial da hifa fúngica através da indução de uma maior utilização das reservas metabólicas dos próprios esporos ou do meio conforme sugerido por BECARD & PICHE (1989).

5. CONCLUSÕES

1. Dentre os 11 flavonóides testados na germinação, biochanina A, flavona, naringenina, hesperetina, taxifolina, morina, quercetina e fisetina apresentaram efeitos inibitórios sobre a germinação de esporos de *G. gigantea*. A atividade inibitória dos flavonóides foi dependente do composto, da concentração utilizada e do período de incubação dos esporos.

2. Os flavonóides apresentaram maior atividade aos 2 dias de incubação enquanto, aos 5 e 10 dias, a atividade inibitória foi reduzida, exceto para a flavona.

3. A presença de uma hidroxila na posição 5 associada à metilação da posição 4 dos isoflavonóides e a insaturação na posição C2-C3 das flavanonas são características comuns dos inibidores da germinação de esporos de *G. gigantea*.

4. Dentre os 14 flavonóides testados, apenas a taxifolina, genisteína, daidzeína, apigenina e flavona não apresentaram efeitos significativos sobre o crescimento micelial de *G. gigantea*. A biochanina A mostrou-se inibitória, enquanto os flavonóides morina, quercetina, fisetina, kaempferol e myricetina; o

isoflavonóide formononetina e as flavanonas naringenina e hesperetina estimularam o crescimento micelial.

5.0 isoflavonóide formononetina e o flavonol quercetina foram os compostos com maior efeito estimulante.

6.A atividade dos flavonóides sobre o crescimento micelial depende do composto e da concentração utilizada.

7.As flavanonas foram mais ativas em concentrações de 1 a 2uM, enquanto os flavonóis foram mais ativos em concentrações mais elevadas.

8.A presença de maior número de grupamentos hidroxila no anel B dos flavonóis, a metilação na posição 4 associada à ausência de hidroxila na posição 5 dos isoflavonóides e a insaturação na posição C2-C3 nas flavanonas associa-se a atividade estimulante destes compostos.

9.A produção de células auxiliares mostrou-se, em geral, mais sensível aos flavonóides que o crescimento micelial.

6. RESUMO

Efeito de flavonóides na germinação e no crescimento assimbiótico de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares.

M. J. Baptista

A simbiose entre fungos micorrízicos vesículo-arbusculares (FMVA) e a maioria das plantas superiores apresenta grande importância ecológica e agrícola devido aos inúmeros benefícios para a nutrição e produtividade das plantas. No entanto, a utilização destes fungos na agricultura é limitada devido a impossibilidade de cultivar esses fungos "in vitro", inviabilizando a produção de inóculo em larga escala.

Recentemente, compostos fenólicos de origem vegetal foram identificados como sinais moleculares para o desenvolvimento de diversas simbioses parasíticas e mutualistas entre plantas e microrganismos. Alguns destes compostos, pertencentes ao grupo dos flavonóides são capazes de estimular a micorrização mas pouco se conhece dos seus efeitos sobre os FMVA "in vitro". No presente trabalho, foram estudados os efeitos de diversos flavonóides sobre a germinação e crescimento micelial assimbiótico dos FMVA *Gigaspora gigantea* (Nicolson & Gerdeman)

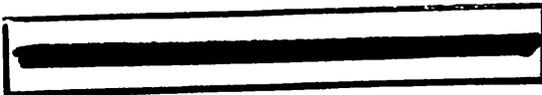
Gerdeman & Trappe e *Glomus clarum* Nicolson & Schenk.

Nos experimentos de germinação, esporos desinfestados foram incubados em meio agar-água 1% suplementado com os diversos flavonóides em concentrações variando de 50 a 400µM. A porcentagem de germinação foi avaliada após 2, 5 e 10 dias de incubação. Nos experimentos de crescimento micelial, esporos pré-germinados em agar-água 1% foram incubados em meio líquido nutritivo suplementado com os diversos flavonóides em concentrações variando de 1 a 10µM. O crescimento micelial foi determinado pelo método de interseção de hifas após 15 dias de incubação.

Dos 11 flavonóides testados na germinação, os flavonóis morina, quercetina e fisetina; o isoflavonóide biochanina A; a flavona e as flavanonas naringenina, hesperetina e taxifolina mostraram efeitos inibitórios, enquanto os isoflavonóides formononetina e genisteína e a flavona apigenina não, apresentaram efeitos significativos sobre a germinação nas concentrações testadas. A atividade inibitória dos flavonóides variou com o composto, com a concentração utilizada e período de incubação. Aos dois dias de incubação, a atividade inibitória foi maior que aos 5 e 10 dias independente da concentração. Neste período a inibição variou de 16% (quercetina 60µM) a 84% (taxifolina 200µM). Dos 14 flavonóis testados sobre o crescimento micelial, apenas a flavona e apigenina; os isoflavonóides genisteína e daidzeína e a flavanona taxifolina não apresentaram efeitos significativos. A biochanina A mostrou-se inibitória e os flavonóis quercetina, myricetina, kaempferol, morina e fisetina; as flavanonas hesperetina e naringenina e o isoflavonóide

formononetina estimularam o crescimento micelial. A magnitude de estímulo ou inibição dos flavonóides foi dependente do composto, da concentração e da espécie fúngica. Verificou-se que a presença de diversos grupos hidroxila no anel B dos flavonóis, a insaturação na posição C2-C3 das flavanonas e a presença de metilação na posição 5 associada a ausência de hidroxila na posição 4 dos isoflavonóides relacionaram-se com a atividade estimulante destes compostos.

Os efeitos dos flavonóides sobre a germinação e crescimento micelial assimbiótico dos fungos MVA indicam seu possível envolvimento como moléculas reguladoras do desenvolvimento fúngico e formação da simbiose micorrízica. Embora estudos adicionais sejam necessários para esclarecer os mecanismos de ação destes compostos sobre os fungos MVA, os resultados aqui relatados indicam a potencialidade desses compostos como componentes de meios de cultura para o crescimento assimbiótico destes fungos e como reguladores da micorrização em plantas.



7. SUMMARY

Effects of flavonoids on germination and mycelial growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi.

M.J. Baptista

Vesicular arbuscular mycorrhizal symbiosis (VAM) are of great ecological and agricultural importance, because of their nutritional benefits and improved plant productivity. However, the use of these fungi in agriculture is still very limited since they can not be grown in pure culture, and inoculum production is very difficult. It has been recently demonstrated that plant phenolic compounds act as signal molecules for the development of several symbiosis between plant roots and microorganisms. In the case of mycorrhizae, the involvement of such compounds is still under investigation. However, some plant flavonoids has been shown to be active against vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. In this study, we examined the effects of several synthetic flavonoid compounds on VAM fungal spore germination and assymbiotic mycelial growth in defined media.

For germination experiments, surface sterilized spores were incubated in water agar 1% supplemented with flavonoids to be tested. Spore germination was assessed after 2, 5 and 10 days of incubation. For the mycelial growth experiments, pre-

germinated spores were transferred to glass tubes containing liquid nutrient media supplemented with various flavonoides at concentration ranging from 1 to 50 μM . Mycelial growth was assessed after 15 days of incubation by a hyphal intersection method.

The flavonols morin, quercetin, fisetin; the isoflavonoid biochanin A; a flavone and the flavanones naringenin, hesperetin and taxifolin exhibited inhibitory effects on spore germination. The inhibitory activity varied with their chemical structure, concentration and incubation period. After 2 days of incubation the inhibitory effect was greater than at 5 or 10 days. Percent inhibition on germination at 2 days, ranged from 16% (quercetin 60 μM) to over 80% for taxifolin at 200 μM and flavone at 100 μM . Other flavonoids such as formononetin, apigenin and genistein showed no inhibitory effects on spore germination.

Most compounds tested showed inhibition for mycelial growth. Only the flavones apigenin and flavone; the isoflavonoids genistein and daidzein and the flavanone taxifolin showed no significant effects on hyphal growth. The isoflavone biochanin A showed linear inhibitory effects, whereas, the flavonols quercetin, myricetin, morin, kaempferol and fisetin; the flavanones hesperetin and naringenin; and the isoflavonoid formononetin stimulated the mycelial growth. Flavonoid activity was related to concentration and chemical structure. The presence of several -OH groups on the B ring of the flavonols and the

insaturation on the C2-C3 position of the flavonones are common features of stimulatory activity of these compounds. The presence of methylation at the 4 position with a hydroxyl group at the 5 position were related to inhibitory activity of the isoflavonoids. The absence of hydroxyl group at the 5 position was related to stimulatory activity of these class of flavonoids.

The results obtained in the present study, suggest that flavonoids exhibit significant effects on both germination and mycelial growth of VAM fungi "in vitro". Such effects can be either stimulatory or inhibitory depending on concentration and type of compound. This indicates the potential role of flavonoids as regulatory signals for fungal development and for VAM establishment.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ADESANYA, S.A. ; O NEILL, M.J. & ROBERTS, M.F. Structure-related fungitoxicity of isoflavonoids *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, 29:95-103, 1986.
2. BARZ, W. & KOSTER, J. Turnover and degradation of secondary (natural) products. In: STUMPF, P.K. & CONN, E.E. *The Biochemistry of Plants*. New York, Academic Press, 1981. V.7, Chap. 3, p.35-84.
3. BECARD, G.; DOUDS, D.D. & PFEFFER, P.E. Extensive in vitro hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO₂ and flavonols. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 58(3):821-5, 1992.
4. BECARD, G. & PICHE, Y. New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytologist*, Cambridge, 112:77-83, 1989.
5. BELL, A.E. The physiological role(s) of secondary (natural) products. In: STUMPF, P.K. & CONN, E.E. *The Biochemistry of Plants*. New York, Academic Press, 1981. V.7, chap. 1, p.1-84.

6. CHABOT, S.; BEL-RHLID, R.; CHENEVERT, R. & PICHE, Y. Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO₂ enriched conditions. *New Phytologist*, Cambridge, 122:461-7, 1992.
7. COLOZZI-FILHO, A. Desinfestação superficial de esporos de fungos micorrizicos vesículo-arbusculares. Lavras, ESAL, 1988. 80p. (Tese MS).
8. DIXON, R.A. & LAMB, C.J. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, Palo Alto, 41:339-67, 1990.
9. DUC, G.; TROUVELOT, A.; GIANINAZZI-PEARSON, V. & GIANINAZZI, S. First report of non-mycorrhizal plant mutants (myc) obtained in pea (*Fisum sativum*) and fababean (*Vicia faba* L.). *Plant Science*, Berkely, 60:215-22, 1989.
10. ELIAS, K.S. & SAFIR, G.R. Hyphal elongation of *Glomus fasciculatum* in response to root exudates. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 53(8):1928-33, 1987.
11. FIRMIN, J.L.; WILSON, K.E.; ROSSEN, L. & JOHNSTON, A.W.B. Flavonoide activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other coumpounds present in plants. *Nature*, London, 324:90-2, 1986.
12. FREITAS, M.H. Efeitos de aminoácidos e peptona sobre o crescimento micelial de *Gigaspora gigantea* "in vitro". Lavras, ESAL, 1990. 63p. (Tese MS).

13. GERDEMANN, J.W. & NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society, London*, 46(2): 235-44, 1963.
14. GIANINAZZI, S. Vesicular-arbuscular (endo-)mycorrhizas: cellular, biochemical and genetic aspects: *Agriculture, Ecosystems and Environment, Amsterdam*, 35:105-19, 1991.
15. GIANINAZZI-PEARSON, V.; BRANZANTI, B. & GIANINAZZI, S. "In vitro" enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. *Symbiosis*, 7:243-55, 1989.
16. GRAHAM, J.H. Effects of citrus root exudates on germination of chlamydospores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus epigaeum*. *Mycologia, New York*, 74(5):831-5, 1982.
17. GRAHAM, T.L. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. *Plant Physiology, Washington*, 95:594-603, 1991.
18. GROSS, G.G. Phenolic acids In: STUMPF, P.K. & CONN, E.E. *The Biochemistry of Plants*, New York, Academic Press, 1981. V.7, chap.11, p.301-16.
19. HAHLBROCK, K. Flavonoids. In: STUMPF, P.K. & CONN, E.E. *The Biochemistry of Plants*. New York, Academic Press. 1981, V.7, chap 14, p.425-56.
20. HALVERSON, L.J. & STACEY, G. Signal exchange en plant microbe interactions. *Microbiological Reviews, Washington*, 50(2): 193-225, 1986.

21. HARTWIG, V.A.; MAXWELL, C.A.; JOSEPH, C.M. & PHILLIPS, D.A. Interactions among flavonoid nod gene inducers released from alfalfa seeds and roots. *Plant Physiology*, Washington, 91:1138-42, 1989.
22. HEPPER, C.M. Limited independent growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in vitro. *The New Phytologist*, Cambridge, 93(4):537-42, 1983.
23. HEPPER, C.M. & SMITH, G.A. Observations on the germination of *Endogone* spores. *Transactions of the British Mycological Society*, London, 66(2):189-94, 1976.
24. HEPPER, C.M. & JAKOBSEN, I. Hyphal growth from spores of the mycorrhizal fungus *Glomus caledonius*: Effect of aminoacids. *Soil Biology and Biochemistry*, Elmsford, 15(1):55-8, 1983.
25. HORVARTH, B.; BACHEM, C.W.B.; SCHELL, J. & KONDOROSI, A. Host specific regulation of nodulation genes in *Rhizobium* is mediated by a plant-signal, interacting with the nod D gene product. *Embo journal*, Oxford, 6:841-8, 1987.
26. HUGRIA, M.; JOSEPH, C.M. & PHILLIPS, D.A. Anthocyanidins and flavonols, major nod gene inducers from seeds of a Black-Seeded Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiology*, Washington, 97:751-8, 1991.
27. KAPULNIK, Y.; JOSEPH, C.M. & PHILLIPS, D.A. Flavone limitations to root nodulation and symbiotic nitrogen fixation in alfalfa. *Plant Physiology*, Washington, 84:1193-96, 1987.
28. KOSKE, R.E. *Gigaspora gigantea*: Observations on spore germination of a VA-mycorrhizal fungus. *Mycologia*, New York, 73:289-300, 1981.

29. KOSSLAK, R.M.; BOOKLAND, R.; BARKEI, J.; PAAREN, H.E. & APPELBAUM, E.R. Induction of Bradyrhizobium japonicum common nod genes by isoflavonoids isolated from Glycine max. Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America, Washington, 84:7428-32, 1987.
30. KRAMER, R.P.; HINDORF, H.; JHA, H.C.; KALLAGE, J. & ZILLINKEN, F. Antifungal activity of soybean and chickpea isoflavones and their reduced chickpea isoflavones and their reduced derivatives. Phytochemistry, London, 23(10):2203-05, 1984
31. LAMB, C.J.; LAWTON, M.A.; DROW, M. & DIXON, R.A. Signal and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. Cell, Cambridge, 56:215-24, 1989.
32. LEI, J.; BECARD, G.; CATFORD, J.G. & PICHE, Y. Root factors stimulate ³²P uptake and plasmalema ATPase activity in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus Gigaspora margarita. New Phytologist, Cambridge, 118:289-94, 1991.
33. LEWIS, D.H. Comparative aspects of the carbon nutrition of mycorrhizas. In: SANDERS, F.E.; MOSSE, B. & TINKER, P.B. Endomycorrhizas. London, Academic Press, 1975. p.119-48.
34. LINDEMBERG, G. & LINDEMBERG, M. Stimulation of litter-decomposing basidiomycetes by flavonoids. Transactions of the British Mycological Society, London, 75(3):455-9, 1980.
35. LONG, S.R. Rhizobium Genetics. Annual Review of Genetics, Palo Alto, 23:483-506, 1989.
36. LOPES, E.S.; SIQUEIRA, J.O. & ZAMBOLIM, L. Caracterização das micorrizas vesicular-arbusculares e seus efeitos no crescimento das plantas. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Piracicaba, 7(1):1-19, 1983.

37. LOUIS, I. & LIM, G. Observations on in vitro sporulation of *Glomus clarum*. Transactions of the British Mycological Society, London, 91(4):698-9, 1988.
38. LYNN, D.G. & CHANG, M. Phenolic signals in cohabitation: implications for plant development. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, Palo Alto, 41:497-526, 1990.
39. MARTINEZ, E.; PALACIOS, R. & SANCHEZ, F. Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. Journal of Bacteriology, Washington, 169(6):2828-34, 1987.
40. MAXWELL, C.A.; HARTWIG, V.A.; JOSEPH, C.M. & PHILLIPS, D.A. A chalcone and two related flavonoids released from alfalfa roots induce nod genes of *Rhizobium meliloti*. Plant Physiology, Washington, 91:842-7, 1989.
41. MELCHERS, L.S.; REGENSBURG-TUINK, A.J.G.; SCHILPERDORT, R.A. & HOODYKAAS, P.J.J. Specificity of signal molecules in the activation of *Agrobacterium* virulence gene expression. Molecular Microbiology, Salem, 3(7):969-77, 1989.
42. MORANDI, D.; BRANZANTI, B. & GIANINAZZI-PEARSON, V. Effect of some plant flavonoids on in vitro behaviour of an arbuscular mycorrhizal fungus. Agronomie, Elsevier, 12:811-6, 1992.
43. MORRIS, P.F. & WARD, E.W.B. Chemoattraction of zoospores of soybean pathogen *Phytophthora sojae* by isoflavones. Physiological and Molecular Plant Pathology, London 40:17-22, 1992.

44. MORTON, P.F. & BENNY, G.L. Revised classification of arbuscular-mycorrhizal fungi (Zigomycetes): A new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon*, Ithaca, N.Y., 37:471-91, 1990.
45. MULLIGAN, J.T. & LONG, S.R. Induction of *Rhizobium meliloti* nod C expression by plant exudate requires nod D. *Proceedings of the National Academic of Science of the United States of America*, Washington, 82:6609-13, 1985.
46. NAIR, M.G.; SAFIR, G.R. & SIQUEIRA, J.O. Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza-stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 57(2):434-9, 1991.
47. NICOLSON, R.L. & HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopatology*, Palo Alto, 30:369-89, 1992.
48. PAULA, M.A. & SIQUEIRA, J.O. Stimulation of hyphal growth of the VA mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* by suspension cultured *Pueraria phaseoloids* cells and cells products. *New Phytologist*, Cambridge, 115:69-73, 1990.
49. PEDERSEN, C.T.; SAFIR, G.R.; SIQUEIRA, J.O. & PARENTS, S. Effects of phenolic compounds on asparagus mycorrhiza. *Soil Biology and Biochemistry*, Elmsford, 23(5):491-4, 1991.
50. PETERS, N.K. & LONG, S.R. Alfafa root exsudates and compounds which promote or inhibit induction of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Plant Physiology*, Washington, 88:369-400, 1988.

51. RAO, A.S. Root flavonoids. *The Botanical Review*, Lancaster, 56(1): 1-84, 1990.
52. ROLFE, G.B. & GRESSHOFF, P.M. Genetic analysis of legume nodule initiation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, Palo Alto, 39:297-319, 1988.
53. SAFIR, G.R.; COLEY, S.C.; SIQUEIRA, J.O. & CARLSON, P.S. Improvement and synchronization of VA mycorrhiza fungal spore germination by short-term cold storage. *Soil Biology and Biochemistry*, Elmsford, 22(1):109-11, 1990.
54. SILVA, L.R.C. Efeitos de compostos orgânicos sobre o crescimento micelial de *Gigaspora gigantea* "in vitro". Lavras, ESAL, 1990. 77p. (Tese MS).
55. SINGH, U.P.; PANDEY, U.B.; SINGH, K.N. & SINGH, R.D.N. Antifungal activity of some new flavones and flavone glycosides of *Echinops echinatus*. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 66:1901-3, 1988
56. SIQUEIRA, J.O. Nutritional and edaphic factors affecting spore germination, germ tube growth and root colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Florida, University of Florida, 1983. 122p. (Tese PhD).
57. SIQUEIRA, J.O. Micorrizas: Forma e Função. In: Reunião Brasileira Sobre Micorrizas, 1. Lavras, 1986. *Anais...* Lavras, ESA1/FAEPE, 1986 p.5-32.
58. SIQUEIRA, J.O. & HUBBELL, D.H. Effects of organic substrates on germination and germ tube growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus spores in vitro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 21(5):523-7, 1986.

59. SIQUEIRA, J.O.; HUBBELL, D.H. & SCHENK, N.C. Spore germination and germ tube growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in vitro. *Mycologia*, New York, 74(6):952-9, 1982.

60. SIQUEIRA, J.O.; HUBBELL, D.H. & MAHAMUD, A.W. Effect of liming on spore germination, germ tube growth and root colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, The Hague, 6:115-24, 1984.

61. SIQUEIRA, J.O.; NAIR, M.G.; HAMMERSCHMIDT, R. & SAFIR, G.R. Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems. *Critical Review in Plant Science*, 10(1):63-121, 1991a.

62. SIQUEIRA, J.O.; ROCHA Jr., W.F.; OLIVEIRA, E. & COLOZZI-FILHO, A. The relationship between vesicular-arbuscular mycorrhiza and lime: Associated effects on the growth and nutrition of brachiaria grass (*Brachiaria decumbens*). *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, 10:65-71, 1990.

63. SIQUEIRA, J.O.; SAFIR, G.R. & NAIR, M.G. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds. *New Phytologist*, Cambridge, 118:87-93, 1991c.

64. SIQUEIRA, J.O.; SAFIR, G.R. & NAIR, M.G. VA-mycorrhizas and mycorrhiza stimulanting isoflavonoid compounds reduce plant herbicide injury. *Plant and Soil*, The Hague, 134:233-42, 1991b.

65. SIQUEIRA, J.O.; SYLVIA, D.M.; GIBSON, F. & HUBBELL, D.H. Spore germination and germ tube growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 31:965-72, 1985.

66. STEFFENS, J.C.; LYNN, D.G.; KAMAT, V.S. & RIOPEL, J.L. Molecular Specificity of Haustorial Induction in *Agalinis purpurea* (L.) Raf. (Scrophulariaceae). *Annals of Botany*, Charlottesville, 50:1-7, 1982.
67. STOSSEL, P. Structure-activity relationship of some bean phytoalexins and related isoflavonoids. *Physiological Plant Pathology*, London, 26:269-77, 1985.
68. TOMMERUP, I.C. Effects of soil water potential on spore germination by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, Washington, 83(2):193-202, 1984.
69. TSAI, S.M. & PHILLIPS, D.A. Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores in vitro. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 57(5):1485-8, 1991.
70. VANETTEN, H.D. Antifungal activity of pterocarpans and other selected isoflavonoids. *Phytochemistry*, London, 15:655-9, 1976.
71. VINCENT, J.M. Factors controlling the legume-Rhizobium symbiosis. In: NEWTON, W.E. & ORME-JOHNSON, W.H. *Nitrogen Fixation*, Baltimore, University Park Press, 1988. V.2, p.103-29.
72. WACKER, T.L.; SAFIR, G.R. & STEPHENSON, S.N. Evidence for succession of mycorrhizal fungi in Michigan asparagus fields. *Acta Horticulturae*, Wageningen 271:273-8, 1990a.
73. WACKER, T.L.; SAFIR, G.R. & STEPHENS, C.T. Effects of ferulic acid on *Glomus fasciculatum* and associated effects on phosphorus uptake and growth of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Journal of Chemical Ecology*, New York, 16(3):901-9, 1990b.

74. WANG, T.S.C.; YANG, TZE-KEN & CHUANG, TZE-TANG. Soil phenolic acids as plant growth inhibitors. *Soil Science*, Maryland, 103(4):239-47, 1967.
75. WEIDENBORNER, M.; HINDORF, H.; JHA, H.C.; TSOTSONOS, F.; EGGE, H. Antifungal activity of isoflavonoids against storage fungi of the genus *Aspergillus*. *Phytochemistry*, London, 28(2):3317-9, 1989.
76. WEIDENBORNER, M.; HINDORF, H.; JHA, H.C.; TSOTSONOS, F. & EGGE, H. Antifungal activity of isoflavonoids in different reduced stages on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. *Phytochemistry*, London, 29(3):801-3, 1990.
77. WHITEHEAD, D.C.; DIBB, H. & HARTLEY, R.D. Phenolic compounds in soil as influenced by the growth of different plant species. *Journal of Applied Ecology*, Oxford, 19:579-88, 1982.
78. ZAAT, S.A.J.; WIJFFELMAN, C.A.; SPAINK, H.P.; VAN BRUSSEL, A.A.N.; OKKER, R.J.H. & LUGTENBERG, B.J.J. Induction of the *NodA* Promoter of *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid PRL1JI by plant flavonoids and flavones. *Journal of Bacteriology*, Washington, 169(1):198-204, 1987.

APENDICE

Tabela 1A. Resumo das análises de variância da porcentagem de esporos de *G. gigantea* germinados em meio agar-água 1% suplementado com Flavonóis. Dados transformados por $\ln x+2$. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Composto/Dias de incubação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Nível de Signif.	r ²	Coefficiente de Variação%
Morina/2	(3)	5,79143	0,00078	-	24,63
R.linear	1	16,1209	0,00018	0,9276	
R.quadr.	1	1,25335	0,12244	1,0000	
R.cúbica	1	0,000002	1,00000	1,0000	
Resíduo	12	0,46158	-	-	
Morina/5	(3)	6,59682	0,00001	-	10,51
R.linear	1	17,9570	0,00001	0,9074	
R.quadr.	1	1,79366	0,00376	0,9980	
R.cúbica	1	0,03973	0,60550	0,9980	
Resíduo	12	0,13718	-	-	
Morina/10	(3)	0,95838	0,00004	-	4,27
R.linear	1	2,38650	0,00002	0,8301	
R.quadr.	1	0,42576	0,00330	0,9781	
R.cúbica	1	0,62855	0,17857	1,0000	
Resíduo	12	0,03115	-	-	
Quercetina/2	(4)	0,25065	0,00372	-	5,10
R.linear	1	0,02881	0,58881	0,0287	
R.quadr.	1	0,2902	0,01548	0,3182	
R.cúbica	1	0,4833	0,00348	0,8002	
Resíduo	15	0,0395	-	-	
Quercetina/5	(4)	0,01058	0,05185	-	1,31
R.linear	1	0,01048	0,10163	0,2479	
R.quadr.	1	0,01976	0,02997	0,7153	
R.cúbica	1	0,00027	0,7817	0,7216	
Resíduo	15	0,00351	-	-	
Quercetina/10	(4)	0,00416	0,14925	-	0,99
R.linear	1	0,00058	0,61307	0,0349	
R.quadr.	1	0,00428	0,17160	0,2936	
R.cúbica	1	0,00325	0,23132	0,4897	
Resíduo	15	0,00210	-	-	
Fisetina/2	(4)	4,94021	0,00001	-	13,38
R.linear	1	2,74718	0,00135	0,1390	
R.quadr.	1	15,6424	0,00001	0,9306	
R.cúbica	1	1,36485	0,01180	0,9997	
Resíduo	15	0,16827	-	-	
Fisetina/5	(4)	0,23128	0,00175	-	4,01
R.linear	1	0,25141	0,01104	0,2718	
R.quadr.	1	0,43836	0,00201	0,7456	
R.cúbica	1	0,23512	0,01327	0,9998	
Resíduo	15	0,03026	-	-	
Fisetina/10	(4)	0,04207	0,00288	-	1,76
R.linear	1	0,04610	0,01510	0,2741	
R.quadr.	1	0,07804	0,00321	0,7379	
R.cúbica	1	0,04397	0,01711	0,9993	
Resíduo	15	0,00623	-	-	

Tabela 2A. Resumo das Análises de variância da porcentagem de germinação de esporos de *G. gigantea* em meio agar-água 1% suplementado com isoflavonóides. Dados transformados por $\ln x+2$. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Composto/Dias de incubação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Nível de Significância	r ²	Coef. de Variação%
Biochanina/2	(4)	1,5916	0,05744	-	25,79
R.linear	1	6,0515	0,00478	0,9505	
R.quadr.	1	0,1123	0,66076	0,9682	
R.cúbica	1	0,1935	0,56731	0,9985	
Desvio	15	0,5479	-	-	
Biochanina/5	(4)	0,2610	0,00039	-	3,99
R.linear	1	1,0112	0,00005	0,9682	
R.quadr.	1	0,0259	0,31080	0,9931	
R.cúbica	1	0,0041	0,68541	0,9970	
Desvio	15	0,0235	-	-	
Biochanina/10	(4)	0,1040	0,01178	-	3,70
R.linear	1	0,3688	0,00127	0,8862	
R.quadr.	1	0,0029	0,72261	0,8932	
R.cúbica	1	0,0024	0,74459	0,8989	
Desvio	15	0,0222	-	-	
Formonon./2	(4)	0,00921	0,96741	-	6,58
R.linear	1	0,02992	0,53540	-	
R.quadr.	1	0,00111	0,89835	-	
R.cúbica	1	0,00092	0,90752	-	
Desvio	15	0,07209	-	-	
Formonon./5	(4)	0,01262	0,57426	-	2,95
R.linear	1	0,038744	0,14673	-	
R.quadr.	1	0,000421	0,87068	-	
R.cúbica	1	0,000211	0,90846	-	
Desvio	15	0,016803	-	-	
Formonon./10	(4)	0,018477	0,36899	-	2,86
R.linear	1	0,059090	0,07086	-	
R.quadr.	1	0,005918	0,55806	-	
R.cúbica	1	0,004080	0,62564	-	
Desvio	15	0,015979	-	-	
Genisteína/2	(4)	0,1080	0,30174	-	6,94
R.linear	1	0,0418	0,51040	-	
R.quadr.	1	0,1287	0,22469	-	
R.cúbica	1	0,0542	0,56925	-	
Desvio	15	0,0809	-	-	
Genisteína/5	(4)	0,0006	0,97756	-	1,68
R.linear	1	0,00009	0,89987	-	
R.quadr.	1	0,00005	0,92734	-	
R.cúbica	1	0,00128	0,64847	-	
Desvio	15	0,0058	-	-	
Genisteína/10	(4)	0,0002	0,98601	-	1,23
R.linear	1	0,00002	0,93350	-	
R.quadr.	1	0,00036	0,74034	-	
R.cúbica	1	0,000012	0,95093	-	
Desvio	15	0,003215	-	-	

Tabela 3A. Resumo das análises de variância da porcentagem de esporos de *G.gigantea* germinados em meio agar-água 1% suplementado com flavanonas. Dados transformados por $y = \ln x + 2$. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Causa da Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Nível de Significância	r ²	Coef. de Variação%
Naring./2	(4)	5,0013614	0,00007	-	16,09
R.linear	1	19,938814	0,00001	0,9967	
R.quadr.	1	0,0001802	0,97845	0,9967	
R.cúbica	1	0,0515369	0,67903	0,9993	
Desvio	15	0,2846164	-	-	
Naring./5	(4)	3,8604984	0,00015	-	13,31
R.linear	1	13,495207	0,00003	0,8739	
R.quadr.	1	1,7916110	0,02086	0,9900	
R.cúbica	1	0,1275494	0,51180	0,9982	
Desvio	15	0,2741437	-	-	
Naring./10	(4)	2,9213115	0,00094	-	13,92
R.linear	1	9,4910659	0,00019	0,8122	
R.quadr.	1	1,9705571	0,02553	0,9809	
R.cúbica	1	0,2015225	0,54945	0,9981	
Desvio	15	0,3274103	-	-	
Hesper./2	(4)	5,2007431	0,00008	-	17,63
R.linear	1	1,125624	0,07085	0,0541	
R.quadr.	1	18,72285	0,0000	2,9541	
R.cúbica	1	0,015700	0,81772	0,9549	
Desvio	15	0,3043814	-	-	
Hesper./5	(4)	2,3402566	0,00002	-	7,57
R.linear	1	0,001523	0,89182	0,0002	
R.quadr.	1	5,1341303	0,00002	0,5486	
R.cúbica	1	0,8165512	0,00785	0,6358	
Desvio	15	0,0872084	-	-	
Hesper./10	(4)	1,6985658	0,00001	-	4,96
R.linear	1	0,0024631	0,80242	0,0004	
R.quadr.	1	3,8697987	0,00001	0,5699	
R.cúbica	1	0,4198895	0,00561	0,6317	
Desvio	15	0,0400742	-	-	
Taxif./2	(4)	7,2789688	0,00001	-	10,50
R.linear	1	28,504875	0,00001	0,9790	
R.quadr.	1	0,2991157	0,07087	0,9893	
R.cúbica	1	0,1122779	0,2562	0,9931	
Desvio	15	0,0808967	-	-	
Taxif./5	(4)	0,3285601	0,00044	-	4,19
R.linear	1	1,2446060	0,00006	0,9470	
R.quadr.	1	0,0458903	0,23717	0,9819	
R.cúbica	1	0,0032926	0,74507	0,9844	
Desvio	15	0,0304581	-	-	
Taxif./10	(4)	0,0627268	0,00468	-	2,31
R.linear	1	0,2318006	0,00048	0,9239	
R.quadr.	1	0,0003094	0,85999	0,9251	
R.cúbica	1	0,0025390	0,63443	0,9352	
Desvio	15	0,0104858	-	-	

Tabela 4A. Resumo das análises de variância da porcentagem de germinação de esporos de *G.gigantea* em meio agar-água 1% suplementado com flavonas. Dados transformados por $Y = \ln X + 2$. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Composto/Dias de incubação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Nível de Significância	Coef. de r^2 Variação%
Flavona/2	(4)	8,15889	0,00001	- 8,26
R.linear	1	39,968434	0,00001	0,9489
R.quadr.	1	1,5649116	0,00043	0,9969
R.cúbica	1	0,0894478	0,26990	0,9996
Desvio	15	0,0683016	-	-
Flavona/5	(4)	10,245692	0,00001	- 4,34
R.linear	1	36,147996	0,00001	0,8820
R.quadr.	1	4,6580123	0,00001	0,9957
R.cúbica	1	0,1764067	0,01452	1,0000
Desvio	15	0,023467	-	-
Flavona/10	(4)	10,886999	0,00001	- 4,21
R.linear	1	37,54719	0,00001	0,8622
R.quadr.	1	5,739783	0,00001	0,9940
R.cúbica	1	0,254061	0,00501	0,9998
Desvio	15	-	-	-
Apigenina/2	(4)	0,1886967	0,16871	- 8,15
R.linear	1	0,0160567	0,69743	-
R.quadr.	1	0,6018704	0,02627	-
R.cúbica	1	0,1011822	0,66552	-
Desvio	15	0,1012018	-	-
Apigenina/5	(4)	0,0314669	0,40744	- 3,96
R.linear	1	0,0001104	0,95075	-
R.quadr.	1	0,0395016	0,26468	-
R.cúbica	1	0,0862909	0,10472	-
Desvio	15	0,0295036	-	-
Apigenina/10	(4)	0,0288179	0,28223	- 3,26
R.linear	1	0,0023485	0,73917	-
R.quadr.	1	0,0678167	0,08694	-
R.cúbica	1	0,0433526	0,16509	-
Desvio	15	0,0206411	-	-

Tabela 5A. Resumo das análises de variância do crescimento micelial de *G. gigantea* em meio líquido, suplementado com flavonóis. Dados transformados por $y = \sqrt{x} + 0,5$ e níveis de concentração transformados por $y = \log x + 1$. ESAL, Lavras - MG. 1993.

Causa da Variação	Graus de liberdade	Quadrado Médio	Nível de Significância	r^2	Coef. de Variação%
Myricetina	(3)	1,0315674	0,03264	-	5,35
R. linear	1	0,0790377	0,56345	0,0255	
R. quadr.	1	0,1019627	0,51285	0,0585	
R. cúbica	1	2,9136854	0,00615	1,0000	
Resíduo	8	0,2118967	-	-	
Kaempferol	(3)	2,5506560	0,00160	-	4,77
R. linear	1	1,1563785	0,02950	0,1511	
R. quadr.	1	3,9789836	0,00159	0,6711	
R. cúbica	1	2,5166225	0,00500	1,0000	
Resíduo	8	0,1682719	-	-	
Morina	(3)	4,4098456	0,02543	-	11,83
R. linear	1	0,4082045	0,50552	0,0309	
R. quadr.	1	12,805130	0,00448	0,9988	
R. cúbica	1	0,0162090	0,88638	1,0000	
Resíduo	8	0,8187203	-	-	
Quercetina	(3)	3,7421465	0,00334	-	7,69
R. linear	1	0,0517113	0,70070	0,0046	
R. quadr.	1	9,3443296	0,00098	0,8370	
R. cúbica	1	1,8304125	0,04343	1,0000	
Resíduo	8	0,3248246	-	-	
Fisetina	(3)	4,8866998	0,00095	-	6,35
R. linear	1	2,4383544	0,01558	0,1663	
R. quadr.	1	11,584949	0,00035	0,9566	
R. cúbica	1	0,6368112	0,15636	1,0000	
Resíduo	8	0,2632889	-	-	

Tabela 6A. Resumo das análises de variância do crescimento micelial de *G. gigantea* em meio líquido suplementado com flavononas. Dados transformados por $y = \sqrt{x} + 0,5$ e níveis de concentração transformados por $y = \log x + 1$. ESAL, Lavras - MG. 1993

Causa da Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Nível de Significância	r ²	Coef. de Variação%
Hesperetina (3)		2,4981797	0,04371	-	9,01
R. linear	1	1,9861282	0,09917	0,2650	
R. quadr.	1	5,4040263	0,01538	0,9861	
R. cúbica	1	0,1044170	0,68393	1,0000	
Resíduo	8	0,5801829	-	-	
Naringenina (3)		3,3170696	0,00458	-	7,27
R. linear	1	6,9751267	0,00200	0,7009	
R. quadr.	1	2,7392277	0,01895	0,9762	
R. cúbica	1	0,2368841	0,57906	1,0000	
Resíduo	8	0,3231346	-	-	
Taxifolina (3)		3,0926210	0,11042	-	12,26
R. linear	1	0,1804334	0,69857	0,0194	
R. quadr.	1	5,0483338	0,06409	0,5636	
R. cúbica	1	4,4091286	0,09097	1,0000	
Resíduo	8	1,1154809	-	-	

Tabela 7A. Resumo das análises de variância do crescimento micelial de *G.gigantea* em meio líquido suplementado com isoflavonóides. Dados transformados por $y=\sqrt{x}+0,5$ e níveis de concentração transformados por $y=\log x+1$. ESAL, Lavras - MG. 1993.

Causa da variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Nível de Significância	r ²	Coef.de Variação
Genisteína	(3)	0,8267149	0,28243	-	11,98
R.linear	1	1,7265743	0,11057		
R.quadr.	1	0,5404421	0,64992		
R.cúbica	1	0,2131342	0,55423		
Resíduo	8	0,5446661	-		
Daidzeína	(3)	0,8411236	0,11133	-	7,96
R.linear	1	0,4660782	0,25047		
R.quadr.	1	1,1607658	0,08456		
R.cúbica	1	0,8965068	0,12234		
Resíduo	8	0,3047117	-		
Formononetina	(3)	1,8393903	0,01328	-	8,80
R.linear	1	0,4193869	0,65122	0,0380	
R.quadr.	1	5,2774692	0,00408	0,5162	
R.cúbica	1	1,7591889	0,06342	0,6756	
Resíduo	8	0,4426173	-	-	
Biochanina A	(3)	10,2181266	0,00033	-	9,91
R.linear	1	30,5300321	0,00009	0,9959	
R.quadr.	1	0,0130133	0,84701	0,9964	
R.cúbica	1	0,1113458	0,59656	1,0000	
Resíduo	8	0,3571124	-	-	

Tabela 8A. Resumo das análises de variância do crescimento micelial de *G.gigantea* em meio líquido suplementado com flavonas. Dados transformados por $y=\sqrt{x}+0,5$ e níveis de concentração transformados por $y=\log x+1$. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Causa da Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Nível de Significância	r ²	Coef.de Variação%
Apigenina	(3)	2,2573036	0,13010	-	11,90
R.linear	1	3,1990393	0,09243	0,4724	
R.quadr.	1	3,5358949	0,07932	0,9945	
R.cúbica	1	0,0369465	0,83734	1,0000	
Resíduo	8	0,8907525	-	-	
Flavona	(3)	2,4047925	0,13637	-	13,16
R.linear	1	4,9716667	0,05209	0,6891	
R.quadr.	1	1,6411806	0,22937	0,9166	
R.cúbica	1	0,6015158	0,54020	1,0000	
Resíduo	8	0,9746258	-	-	

Tabela 9A. Resumo das análises de variância do número de células auxiliares produzidas por *G.gigantea* em meio líquido. Dados transformados por $Y = \sqrt{x} + 0,5$ e níveis de concentração transformados por $Y = \log X + 1$. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Causa da Variação	Graus de liberdade	Quadrado Médio	Nível de Significância	r ²	Coef. de variação%
Myricetina	(3)	0,3668961	0,00994	-	10,87
R.linear	1	0,1013811	0,18038	0,0921	
R.quadr.	1	0,9958712	0,00216	0,9969	
R.cúbica	1	0,0034375	0,78972	1,0000	
Resíduo	8	0,0475347	-	-	
Kaempferol	(3)	0,8928670	0,03982	-	27,11
R.linear	1	1,2185909	0,03718	0,4549	
R.quadr.	1	1,1221487	0,04349	0,8739	
R.cúbica	1	0,3378618	0,22790	1,0000	
Resíduo	8	0,1992758	-	-	
Morina	(3)	0,0724117	0,36941	-	20,91
R.linear	1	0,0190001	0,59429	0,0875	
R.quadr.	1	0,1216646	0,19103	0,6475	
R.cúbica	1	0,0765701	0,29222	1,0000	
Resíduo	8	0,0601705	-	-	
Quercetina	(3)	0,2188295	0,00396	-	12,10
R.linear	1	0,2617272	0,00711	0,3987	
R.quadr.	1	0,3701224	0,00302	0,9625	
R.cúbica	1	0,0246388	0,30210	1,0000	
Resíduo	8	0,0202066	-	-	
Fisetina	(3)	2,0392382	0,00003	-	10,42
R.linear	1	0,5933124	0,00092	0,0970	
R.quadr.	1	4,1931151	0,00002	0,7824	
R.cúbica	1	1,3312858	0,00014	1,0000	
Resíduo	8	0,0201405	-	-	
Apigenina	(3)	0,6929755	0,03823	-	31,263
R.linear	1	1,1236090	0,02539	0,5405	
R.quadr.	1	0,7203116	0,05928	0,8870	
R.cúbica	1	0,2350059	0,24812	1,0000	
Resíduo	8	0,1520221	-	-	
Flavona	(3)	1,4208852	0,00360	-	19,60
R.linear	1	0,0403343	0,59280	0,0095	
R.quadr.	1	4,1914901	0,00069	0,9928	
R.cúbica	1	0,0308298	0,63854	1,0000	
Resíduo	8	0,1266755	-	-	
Taxifolina	(3)	1,4728240	0,00034	-	15,35
R.linear	1	0,0426533	0,60362	0,0097	
R.quadr.	1	3,2644900	0,00016	0,7485	
R.cúbica	1	1,1113293	0,00209	1,0000	
Resíduo	8	0,0523277	-	-	
Naringenina	(3)	0,4029713	0,02351	-	16,53
R.linear	1	0,3223517	0,06606	0,2666	
R.quadr.	1	0,8214551	0,00980	0,9461	
R.cúbica	1	0,0651073	0,62626	1,0000	
Resíduo	8	0,0725236	-	-	

Tabela 9A.(Cont...).Resumo das análises de variância do número de células auxiliares produzidas por *G.gigantea* em meio líquido. Dados transformados por $Y=\sqrt{x+0,5}$. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Causa da Variação	Graus de liberdade	Quadrado Médio	Nível de Significância	r ²	Coef. de variação%
Hesperetina	(3)	0,3385285	0,14736	-	22,34
R.linear	1	0,0493071	0,57890	0,0486	
R.quadr.	1	0,6897139	0,05784	0,7277	
R.cúbica	1	0,2765637	0,20084	1,0000	
Resíduo	8	0,1435081	-	-	
Formononetina	(6)	0,3974489	0,00023	-	10,53
R.linear	1	0,0252925	0,58882	0,0106	
R.quadr.	1	1,0088203	0,00022	0,4336	
R.cúbica	1	0,2005789	0,02888	0,5178	
Resíduo	14	0,0345766	-	-	
Biochanina A	(3)	0,7982024	0,00117	-	18,80
R.linear	1	2,2353877	0,00029	0,9335	
R.quadr.	1	0,0122164	0,62657	0,9386	
R.cúbica	1	0,1470030	0,11148	1,0000	
Resíduo	8	0,0466476	-	-	
Daidzeína	(3)	0,1657489	0,17153	-	31,31
R.linear	1	0,0380089	0,50768	0,0764	
R.quadr.	1	0,3490599	0,06396	0,7784	
R.cúbica	1	0,1101776	0,26552	1,0000	
Resíduo	8	0,0770323	-	-	
Genisteína	(3)	0,0399266	0,30316	-	19,12
R.linear	1	0,0052044	0,67864	0,0435	
R.quadr.	1	0,1073077	0,08312	0,9393	
R.cúbica	1	0,0072671	0,62722	1,0000	
Resíduo	8	0,0278580	-	-	

Tabela 10A. Resumo das análises de variância do número de intersceções de hifas de *Glomus clarum* cultivado em meio de Hepper suplementado com quercetina e formononetina. Dados transformados por $y = \sqrt{x} + 0,5$. ESAL, Lavras - MG. 1993.

Causa da Variação	GL	QM	Nível de Significância	R2	CV %
Quercetina	(3)	0,7037108	0,01505	-	14,113
R.linear	1	1,8997233	0,00323	0,8999	
R.quadr.	1	0,0096886	0,76683	0,9045	
R.cúbica	1	0,2017183	0,20453	1,0000	
Resíduo	8	0,1065531	-	-	
Formonon.	(3)	0,9448334	0,00241	-	14,259
R.linear	1	0,7922029	0,01072	0,2795	
R.quadr.	1	0,3824104	0,04928	0,4144	
R.cúbica	1	1,6598868	0,00174	1,0000	
Resíduo	8	0,0726905	-	-	

Tabela 11A. Resumo das análises de variância do PH dos meios nutritivos suplementados com flavonóides após 15 dias de incubação. ESAL, Lavras - MG, 1993

Causa da Variação	GL	QM	Nível de Significância	Coefficiente de Variação (%)
Morina	3	0,2633348	0,02364	4,07
Resíduo	8	0,0474994		
Kaempferol	4	0,0543320	0,01393	1,86
Resíduo	10	0,0100005		
Myricetina	4	0,3556654	0,00001	1,31
Resíduo	10	0,0046672		
Fisetina	4	0,2476680	0,12423	6,26
Resíduo	10	0,1053328		
Quercetina	3	0,0122205	0,88480	4,51
Resíduo	8	0,0575006		
Apigenina	3	0,1311131	0,00358	1,98
Resíduo	8	0,0116659		
Flavona	3	0,2275036	0,00160	2,30
Resíduo	8	0,0149987		
Naringenina	3	0,7533334	0,00129	4,31
Resíduo	8	0,0458333		
Taxifolina	4	0,1376705	0,00986	2,78
Resíduo	10	0,0226651		
Hesperetina	4	0,3140053	0,02267	4,96
Resíduo	10	0,0679979		
Formononet.	7	0,1685770	0,00225	3,11
Resíduo	16	0,0295809		
Biochanina	4	0,1706693	0,06545	4,31
Resíduo	10	0,0546656		
Daidzeína	4	0,2306666	0,00049	2,52
Resíduo	10	0,0146667		
Genisteína	4	0,4376655	0,00008	2,43
Resíduo	10	0,0146671		

Tabela 12A. Resumo das análises de variância do crescimento micelial de *G. gigantea* em meio líquido nutritivo com diferentes PHs.

Causa da Variação	GL	QM	Nível de Significância	Coefficiente de Variação(%)
PH	3	0,2678666	0,93292	18,78
Resíduo	8	1,9195486		
Total	11			