

BENEFÍCIOS DA SUSPENSÃO DE CÉLULAS VEGETAIS PARA OS FUNGOS MICORRÍZICOS VESÍCULO-ARBUSCULARES *IN VITRO*. I. EFEITO DA ESPÉCIE VEGETAL E DA IDADE DAS CÉLULAS¹

MAURO AUGUSTO DE PAULA², JOSÉ OSWALDO SIQUEIRA³,
JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO e MOACIR PASQUAL⁴

RESUMO - Avaliaram-se os efeitos da adição de suspensão de células de diferentes espécies vegetais sobre a taxa de germinação de esporos e crescimento micelial de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares (FMVA), visando o estabelecimento de cultura monoxênica e a esporulação destes fungos na ausência de raízes vivas. A adição de suspensão de células de alfafa, batata, batata-doce, puerária e tomateiro em meio ágar-água, onde zigósporos desinfestados de *Gigaspora margarita*, *Gigaspora gigantea* e *Scutellospora heterogama* foram plaqueados, aumentou a taxa de germinação e o crescimento micelial. Esses efeitos foram máximos quando se utilizou suspensão de células de puerária, com seis dias de idade. A presença de células promoveu crescimento abundante e mais prolongado, exercendo estímulos de até 200%. O crescimento do tubo germinativo, embora estimulado, não foi direcionado para as células vegetais, como também não foram verificados indícios de colonização destas pelas hifas do fungo, nem observados sinais visuais de esporulação.

Termos para indexação: crescimento micelial, esporos, cultura monoxênica, ausência de raízes vivas, zigósporos.

BENEFITS OF PLANT CELL SUSPENSION TO VESICULAR-ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI *IN VITRO*. I. EFFECTS OF PLANT SPECIES AND CELL SUSPENSION AGE

ABSTRACT - The effects of addition of cell suspension on germination, rate and micelial growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi spores *in vitro* were studied, aiming to establish monoxenous culture and sporulation of these fungi in the absence of living roots. Application of lucerne, potato, sweet potato, pueraria and tomato plant cells into agar-plates containing desinfested zygospores of *Gigaspora margarita*, *Gigaspora gigantea* and *Scutellospora heterogama*, increased zygospore germination and favoured their germ tube growth. The beneficial effects were maximum when six-day old pueraria cells were utilized. These cells stimulated micelial growth by as much as 200%, over the no cells control. However, neither hyphal growth was directed towards the plant cells nor visual signs of cell colonization by the hyphae or fungal sporulation were observed.

Index terms: micelial growth, spores, monoxenous culture, absent living roots, zygospores.

INTRODUÇÃO

Os efeitos benéficos causados pela inoculação de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares (FMVA) sobre o crescimento e nutrição de espécies vegetais de interesse agrônomo são bastante acentuados e de grande potencial para utilização prática (Abbott & Robson 1984 e Zambolin & Siqueira 1985).

¹ Aceito para publicação em 14 de novembro de 1989.
Extraído da dissertação de Mestrado apresentada ao Dep. de Ciência do Solo, ESAL, pelo primeiro autor. Financiada pelo PADCT-FINEP-CNPq.

² Eng.-Agr., M.Sc., EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Biologia do Solo (CNPBS), Rodovia Rio-São Paulo, Km 47 CEP 23851 Seropédica, RJ.

³ Eng.-Agr., Ph.D., Prof. Adj., ESAL, Dep. de Ciência do Solo, Bolsista do CNPq.

⁴ Eng.-Agr., Ph.D e D.Sc., respectivamente, Prof. Adj., ESAL, Dep. de Agricultura.

Embora esses fungos ocorram de maneira generalizada na natureza, a efetividade simbiótica dos nativos para a planta hospedeira é, geralmente, baixa (Lopes et al. 1983), e a inoculação com espécies de elevada efetividade poderá contribuir para aumentar os benefícios desta simbiose para as culturas (Powell 1984). Porém, considerando que os FMVA são simbiotróficos obrigatórios, o crescimento e esporulação destes em meios de cultura, na ausência de raízes vivas, ainda não foi conseguido (Siqueira 1987), e o inoculante, tanto para pesquisa quanto para comercialização, tem de ser produzido através da multiplicação em plantas inoculadas, crescendo em vasos com substratos desinfetados em casa de vegetação (Menge 1984).

Sendo, a dificuldade de obtenção de inoculante de qualidade e viabilidade comprovada, o principal obstáculo para a utilização dos FMVA em larga escala, estudos visando o crescimento e esporulação destes fungos na ausência da planta hospedeira são da maior importância; tal crescimento, tem sido amplamente estudado em condições axênicas e monoxênicas com plantas, raízes destacadas e suspensão de células (Hepper 1984 e Siqueira 1987).

Estudos preliminares utilizando suspensão de células vegetais obtidas *in vitro* mostraram que as células podem estimular tanto a germinação quanto o crescimento micelial de FMVA (Carr et al. 1985). No entanto, como as células vegetais possuem elevadas exigências nutricionais para crescimento, elas exigem meios bastante ricos em nutrientes (Street 1973, Wilson et al. 1971), ao contrário dos FMVA, que são inibidos pela presença de elevadas concentrações de nutrientes orgânicos (Hepper 1984). A formulação de meios de cultura apropriados para células e esporos de FMVA, juntamente com estudos sobre os efeitos da suspensão de células de diferentes espécies vegetais, idade e viabilidade destas, podem contribuir para o esclarecimento dos fatores nutricionais requeridos para o cultivo e multiplicação destes fungos *in vitro*, conforme relatado no presente estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

Calos e suspensão de células de alfafa (*Medicago sativa* L.), batata (*Solanum tuberosum* L.), batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) Lam.), puerária (*Pueraria phaseoloides* (Roxb. Benth) e tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) e a suspensão de células destinadas a cultura com FMVA, foram obtidos conforme metodologia descrita em Paula et al. (1990).

Os fungos *Gigaspora margarita* (Becker & Hall), *Gigaspora gigantea* (Nicolson & Gerdemann) Gerdemann & Trappe e *Scutellospora heterogama* (Walker & Sanders) foram selecionados para a condução deste estudo, dada a sua elevada esporulação em vasos de cultivo com planta multiplicadora, facilidade, rapidez e elevada taxa de germinação *in vitro*. Eles foram multiplicados em vasos de cultivo com *Brachiaria decumbens* Stapf Prain, tendo como substrato uma mistura de solo/vermiculita na proporção de 3:1. Após cinco meses de cultivo, os zigósporos foram separados pelo método do peneiramento úmido (Gerdemann & Nicolson 1963), seguindo-se centrifugação em água por três minutos a 3.000 rpm, e em sacarose 45% por 2 min a 2.000 rpm, lavados em água destilada, e selecionados pelo uso de microscópio estereoscópico (40x) quanto à sua morfologia e ausência de germinação. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, os zigósporos foram transferidos com auxílio de seringas para unidades de filtração Millipore, para desinfestação superficial, que foi realizada com hipoclorito de sódio a 0,5% por 6 min, seguido de lavagens sucessivas com água destilada e autoclavada. Em seguida, lotes de dez zigósporos foram transferidos, com o uso de micropipetas de Pasteur, para placas de 60 mm de diâmetro, contendo 20 ml de meio ágar-água 0,7% e pH 6,4. Para avaliar os efeitos da adição de células, os zigósporos foram transferidos para a superfície do meio, no centro de placas, aplicando-se em seu redor, através de pipetagem, a suspensão de células vegetais. A influência da idade das suspensões de células obtidas de calos de hipocótilo de alfafa, batata-doce, puerária e tomateiro, na germinação e crescimento micelial de zigósporos de *G. margarita*, utilizaram os seguintes tratamentos, todos com seis repetições: 45 µl de sacarose 0,2%, contendo aproximadamente 700 células das diferentes espécies vegetais, provenientes de culturas com seis, doze e dezoito dias de incubação, com viabilidade em torno de 70%, e um controle com adição de 45 µl de sacarose 0,2% sem células.

Em outro experimento, foram avaliados os efeitos das suspensões de células sobre a germinação e crescimento micelial de outras espécies de FMVA. Suspensão contendo aproximadamente 700 células das diferentes espécies vegetais, com seis dias de idade e viabilidade em torno de 85%, foram adicionadas a placas contendo ágar-água e esporos de *G. gigantea*, *G. margarita* e *S. heterogama*. O controle constou de azigósporos crescendo em meio com adição de 45 µl de sacarose 0,2% e sem células, sendo todos os tratamentos repetidos seis vezes.

Após a instalação dos experimentos, placas foram vedadas com fita de plástico autocolante e mantidas em condições de baixa umidade, incubadas a 25°C no escuro. O experimento foi conduzido até a paralisação do crescimento micelial, evidenciado pelo surgimento de septos e pela redução ou interrupção dos movimentos citoplasmáticos bidirecionais (cicloze) nas hifas (Siqueira 1987 e Sward 1981), sendo as avaliações feitas em microscópio estereoscópico, em aumento de 40x. Nos experimentos em meio de cultivo com ágar, foram avaliadas a velocidade e taxa de germinação dos azigósporos, crescimento micelial, número de pontas de hifas e de células auxiliares. O crescimento micelial foi avaliado utilizando-se um sistema de categorias de crescimento, baseado em Siqueira et al. (1982), conforme Fig. 1. Cada azigósporo foi avaliado segundo essas categorias de crescimento, de modo a constituir dez avaliações por placa. Para melhor representatividade do crescimento micelial de cada tratamento, foi utilizada a mediana das categorias de crescimento, ou seja, aquela que ocupou a posição central, precedida e seguida pelo mesmo número de observações.

Os tratamentos de todos os experimentos foram delineados inteiramente ao acaso, tendo no mínimo quatro repetições, sendo cada experimento repetido pelo menos duas vezes, e os resultados de ambos, reunidos para a análise estatística. Os resultados de percentagem de germinação e contagens de pontas de hifas e intersecções em placas quadriculadas foram analisados estatisticamente, de acordo com o programa AVBRPOL, no Centro de Processamento de Dados da ESAL, usando as transformações de $Y = \arcsin \sqrt{x/100}$ e $Y = \sqrt{t + 0,5}$, quando x se referia à percentagem, e t, aos dados de contagem. A apresentação e discussão dos resultados foram feitas conforme a significância dos fatores e interações na análise de variância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

São apresentados os resultados de vários experimentos sobre a influência da presença de células vegetais e sua idade na taxa de germinação e crescimento micelial dos FMVA.

Tanto as suspensões de células de diferentes espécies vegetais como a idade destas influenciaram significativamente a germinação dos azigósporos e o número de pontas de hifas de *G. margarita* (Fig. 2).

Todos os tratamentos com adição de células apresentaram taxa de germinação superior à do controle, sendo as maiores taxas observadas no tratamento com adição de células de puerária, seguido pelos tratamentos com células de alfafa, batata-doce e tomateiro.

As maiores taxas de germinação foram obtidas com a adição de células com doze dias

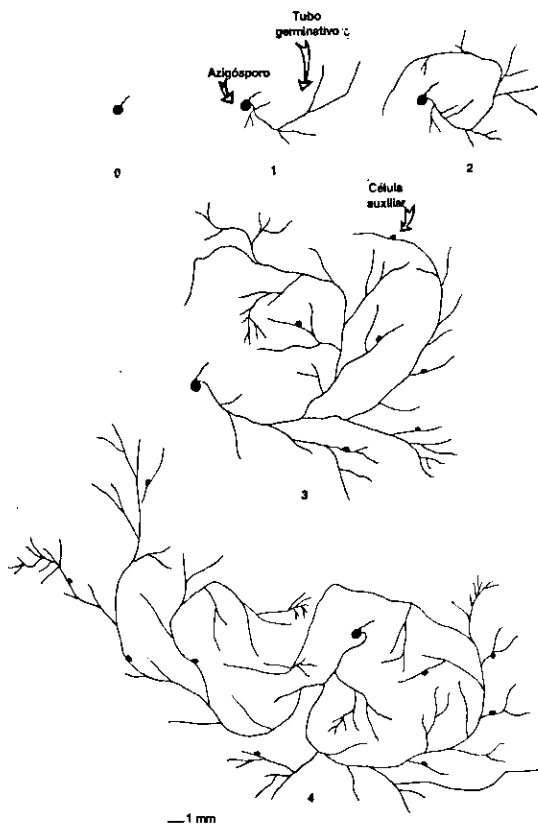


FIG. 1. Categorias de crescimento de esporos germinados de FMVA *in vitro*.

de idade; no entanto, em relação ao controle, foi com a adição de células de alfafa, batata-doce e puerária com seis dias de cultivo, que se obteve incremento de até 90% na taxa de germinação.

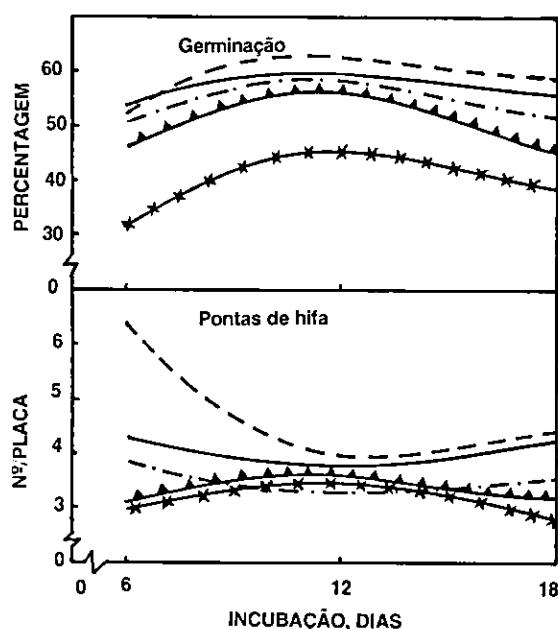


FIG. 2. Efeito da adição de suspensão de células com diferentes idades sobre a germinação e número de pontas de hifas de *Gigaspora margarita* em meio ágar-água.

O maior número de pontas de hifas foi observado com células de puerária com seis dias de cultivo; os demais tratamentos apresentaram pequenas diferenças entre si.

Efeitos diferenciados para idade das células foram observados em maior magnitude apenas para puerária; para as demais espécies vegetais, além de apresentarem pequena diferença quanto à idade, mostraram resultados próximos aos do controle, à exceção de alfafa, que, a partir de doze dias, mostrou comportamento semelhante ao do tratamento com células de puerária. O crescimento micelial foi maior quando foram adicionadas células de puerária com seis e doze dias; no entanto, células desta espécie com 18 dias propiciaram crescimento da *G. margarita* semelhante ao das demais espécies em estudo (Tabela 1).

Todos os tratamentos com células foram superiores ao controle, que apresentou pequeno crescimento micelial e formação de septos já aos 20 dias, ao passo que na presença de células a septação ocorreu com apenas 35 dias de incubação. O número de células auxiliares foi maior com adição de células de puerária com seis dias de cultivo, com pequena diferença entre os demais tratamentos, sendo rara a ocorrência dessas estruturas no controle sem células (Tabela 1).

Apesar de os esporos de FMVA apresentarem todos os requisitos para germinação *in vi-*

TABELA 1. Média de categorias de crescimento micelial e número de células auxiliares de *G. margarita* em meio ágar-água na presença e ausência de suspensão de células vegetais, com diferentes tempo de incubação (dias). Baseada em 12 repetições.

Células	Idade das células, dias			Idade das células, dias		
	6	12	18	6	12	18
Categoria de crescimento				Células auxiliares		
				nº placa		
Alfafa	2	2	2	3	2	3
Batata-doce	2	2	2	3	2	3
Puerária	3	3	2	7	4	3
Tomateiro	2	2	2	2	0	1
Sem célula	1	1	1	0	0	1

tro (Siqueira et al. 1985), a presença de células vegetais exerceu efeito estimulante. Isso pode estar relacionado à exsudação de fatores estimulantes, que, ainda de natureza não conhecida, parece envolver compostos que se difundem no meio de cultivo, bem como outros de natureza volátil (Carr et al. 1985). Estes compostos podem ser bastante diversificados e variáveis em função da espécie vegetal, idade da cultura, meio e condições de cultivo. Apesar de Carr et al. (1985) terem observado pequenas diferenças no crescimento micelial para idade e espécie vegetal, as características de crescimento micelial aqui observadas (Fig. 2 e Tabela 1) indicam maior efeito estimulante quando se adicionaram células de puerária com seis dias de cultivo. Pouco é descrito na literatura sobre a composição bioquímica dessa espécie vegetal; porém, como representante da família Fabaceae (leguminosas), é possível que a puerária apresente elevado teor de proteínas, aminoácidos ou outros compostos nitrogenados considerados estimulantes para crescimento dos FMVA *in vitro* (Hepper 1984).

De acordo com Phan et al. (1987), em suspensões de células, os açúcares solúveis e ácidos orgânicos aumentam até aos 10 dias de cultivo, decrescendo a partir desta idade, ao

passo que as concentrações de compostos fenólicos e proteínas aumentam durante o período de cultivo. Isto poderia também explicar o maior benefício no crescimento micelial da *G. margarita*, quando células com seis dias de idade foram utilizadas. Além das mudanças bioquímicas relatadas, a baixa viabilidade de células com doze e dezoito dias de idade, em comparação às células com seis dias, pode ter atuado diminuindo a magnitude dos efeitos estimulantes nelas presentes.

O micélio de *G. margarita* não apresentou crescimento direcionado para as células vegetais, o que indica que os compostos benéficos, voláteis ou não, podem difundir-se no meio de cultivo (Carr et al. 1985). Não foi verificado início de colonização das células pelas hifas, nem mesmo estímulo à formação de estruturas típicas de infecção e esporulação, conforme relatado por Bécard & Fortin (1988).

Respostas diferenciadas entre as espécies de FMVA à presença de suspensão de células podem ocorrer, visto que a adição de células de diferentes espécies vegetais influenciou significativamente a germinação e o número de pontas de hifas de *G. margarita*, *S. heterogama* e *G. gigantea* (Fig. 3 e Tabela 2).

Como verificado anteriormente no experimento com a idade de células, todos os trata-

TABELA 2. Número médio¹ de pontas de hifas e medianas de categorias de crescimento micelial e número de células auxiliares de *G. gigantea* (gig), *G. margarita* (mar) e *S. heterogama* (het) em meio ágar-água, na presença e ausência de suspensão de células vegetais. Baseado em 12 repetições.

Células	Pontas de hifa, n°/placa			Categoria de crescimento			Células auxiliares, n°/placa		
	gig	mar	het	gig	mar	het	gig	mar	het
Alfafa	145 bA	48 aB	58 aB	3	2	2	13	6	0
Batata	214 aA	18 bC	44 abB	3	2	2	12	4	3
Batata-doce	158 bA	20 bC	46 abB	3	2	2	2	0	0
Puerária	240 aA	52 aB	64 aB	4	3	3	15	9	7
Tomateiro	134 bA	19 bC	42 abB	3	2	2	5	0	0
Sem célula	117 bA	15 bB	24 bB	2	1	1	0	0	0

¹ As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%; as letras minúsculas são usadas para comparar os tratamentos com célula e as maiúsculas, para fungo.

mentos com adição de células apresentaram taxa de germinação superior à do controle, destacando-se o tratamento com células de puerária (Fig. 3). As taxas de germinação dos zigósporos de *G. gigantea* foram significativamente superiores às observadas para *G. margarita* e *S. heterogama*, que não diferiram entre si. O número de pontas de hifas de *G. margarita* e *S. heterogama* foi maior quando foram adicionadas células de alfafa e puerária, não havendo diferenças entre as demais células vegetais e o tratamento controle, ao passo que para *G. gigantea*, o maior número de pontas de hifas foi observado com a adição de células de batata e puerária, as demais espécies vegetais também não diferiram em relação ao controle (Tabela 2). Em todos os tratamentos, *G. gigantea* apresentou o maior número de pontas de hifas, sendo que *S. heterogama* superou *G. margarita* nos tratamentos com células de batata, batata-doce e tomateiro, não diferindo entre si para as demais espécies. O crescimento micelial foi maior com a adição de células de puerária para as três espécies de FMVA. Com a adição dessas células, *G. gi-*

gantea apresentou o maior crescimento micelial (Tabela 2) em relação ao verificado para *G. margarita* e *S. heterogama*. Nos tratamentos com adição de células de alfafa, batata, batata-doce e tomateiro, o crescimento de *G. gigantea* igualou-se ao verificado para *G. margarita* e *S. heterogama*, na presença de células de puerária. Além disso, nesse tratamento foi verificado o maior número de células auxiliares (Tabela 2).

A superioridade do crescimento micelial da *G. gigantea* pode estar associado ao maior conteúdo de reservas dos zigósporos, visto que estes podem apresentar diâmetro de 183-500x291-812 μm e crescimento elevado, mesmo na ausência de células vegetais. Porém, a possibilidade de um melhor aproveitamento dos fatores estimulantes das células vegetais e melhor adaptabilidade às condições de cultivo adotadas, não podem ser descartadas. Independente da espécie de FMVA, células de puerária com seis dias de incubação aumentaram o crescimento micelial, porém em nenhum caso foram verificados sinais de colonização de células e esporulação. A formação de sep-

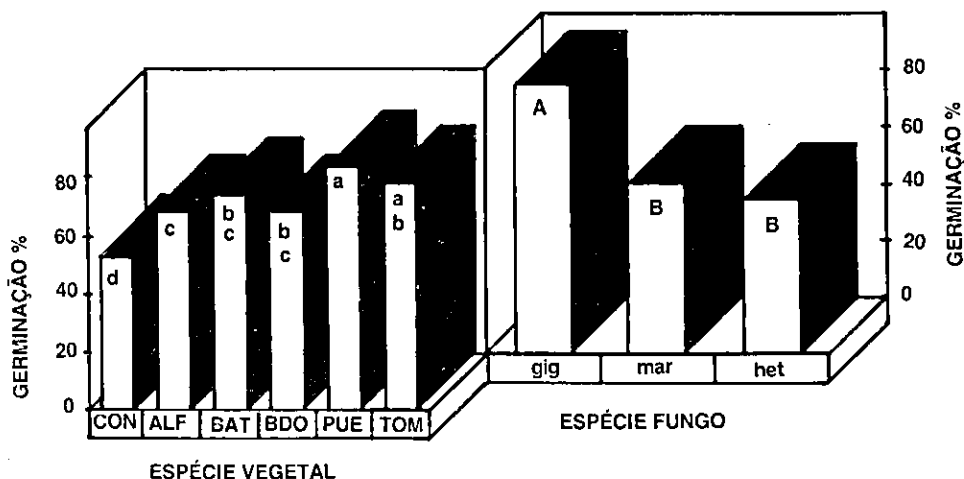


FIG. 3. Efeito da adição de suspensão de células com seis dias de idade das diferentes espécies vegetais na germinação de *Gigaspora gigantea* (gig), *Gigaspora margarita* (mar) e *Scutellospora heterogama* (het) em meio ágar-água. Médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. CON - sem célula; ALF - alfafa; BAT - batata; BDO - batata-doce; PUE - puerária e TOM - tomateiro.

tos e paralisação do crescimento micelial ocorreram aos 40 dias após a incubação; estas características foram mais visíveis em micélio de *G. gigantea*. Essa espécie, graças ao crescimento mais rápido e abundante, parece exaurir mais rapidamente as reservas presentes no zigósporo, bem como os fatores estimulantes presentes no meio de cultivo.

Os resultados aqui apresentados confirmam os estudos preliminares envolvendo suspensão de células e FMVA, conduzidos por Carr et al. (1985) e evidenciam que os benefícios para a germinação e crescimento micelial dependem da espécie vegetal, idade e viabilidade das células e da espécie de FMVA. Outros estudos visando quantificação, manutenção da viabilidade das células, bem como suplementações do meio de cultura, poderão maximizar esses efeitos benéficos das células e permitir um melhor conhecimento dos fatores estimulantes presentes neste sistema.

CONCLUSÕES

1. A adição de suspensão de células vegetais em meios contendo esporos de FMVA aumentou a taxa de germinação e o crescimento micelial em até 90 e 200%, respectivamente.
2. A magnitude dos benefícios da suspensão de células para os FMVA depende da espécie vegetal, da idade das células e da espécie de fungo.
3. A suspensão de células de hipocótilo de puerária com seis dias foi a que exerceu maior efeito estimulante aos esporos.
4. O crescimento de hifas do tubo germinativo dos esporos não foi direcionado para as células vegetais; também não foram verificados indícios de colonização destas pelas hifas.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, L.K. & ROBSON, A.D. The effect of mycorrhizae on plant growth. In: POWELL, C.L. & BAGYARAJ, D.S., eds. *VA mycorrhiza*. Boca Raton, CRC Press, 1984. p.113-30.

BÉCARD, G. & FORTIN, J.A. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.*, London, 108(2):211-8, 1988.

CARR, G.R.; HINKLEY, M.A.; LE TACON, F.; HEPPER, C.M.; JONES, M.G.K.; THOMAS, E. Improved hyphal growth of two species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of suspension-cultured plant cells. *New Phytol.*, London, 101:417-26, 1985.

GERDEMANN, J.W. & NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal Endogene species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, London, 46:235-44, 1963.

HEPPER, C.M. Isolation and culture of VA mycorrhizal (VAM) Fungi. In: POWELL, C.L. & BAGYARAJ, D.S., eds. *VA mycorrhiza*. Boca Raton, CRC Press, 1984. p.95-112.

LOPES, E.S.; SIQUEIRA, J.O.; ZAMBOLIN, L. Caracterização das micorrizas vesicular-arbusculares (MVA) e seus efeitos no crescimento das plantas. *Rev. bras. Ci. Solo*, Campinas, 7(1):1-19, 1983.

MENGE, J.A. Inoculum production. In: POWELL, C.L. & BAGYARAJ, D.S., eds. *VA mycorrhiza*. Boca Raton, CRC Press, 1984. p.187-204.

PAULA, M.A.; PINTO, J.E.B.P.; SIQUEIRA, J.O.; PASQUAL, M. Obtenção de calos e suspensão de células de diferentes espécies vegetais. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 25(6):889-895, jun. 1990.

PHAN, C.T.; DO, C.B.; HEGEDUS, P. Metabolic aspects of *in vitro* culture of plants; problems and applications - comparison of soluble contents, marker enzymes between explant, callus and cell suspension culture. *Experiments. Biology*, 46(3):58, 1987.

POWELL, C.L. Field inoculation with VA mycorrhizal fungi. In: POWELL, C.L. & BAGYARAJ, D.S., eds. *VA mycorrhiza*. Boca Raton, CRC Press, 1984. p.205-22.

SIQUEIRA, J.O. Cultura axênica e monoxênica de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 2, São Paulo, 1987. *Programas e resumos* . . . São Paulo, SEMA/SA/USP, 1987. p.44-70.

- SIQUEIRA, J.O.; HUBELL, D.H.; SCHENCK, N.C. Spore germination and germ tube growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in *in vitro*. *Mycologia*, New York, **74**(6):952-9, 1982.
- SIQUEIRA, J.O.; SYLVIA, D.M.; GIBSON, J.; HUBELL, D.H. Spores germination and germ tubes of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Can. J. Microb.*, Ottawa, **31**(11):965-72, 1985.
- STREET, H.E. Cell (suspension) cultures: techniques. In: STREET, H.E., ed. **Plant tissue and cell culture**. Berkeley, University of California, 1973. p.59-99.
- SWARD, R.J. The structure of the spores of *Gigaspora margarita*. III. Germ-tube emergence and growth. *New Phytol.*, London, **88**:667-73, 1981.
- WILSON, S.B.; KING, P.J.; STREET, H.E. Studies on the growth in culture of plant cells. XII. A versatile system for the large scale bath or continuous culture of plant cell suspensions. *J. Exp. Bot.*, London, **21**:177-207, 1971.
- ZAMBOLIN, L. & SIQUEIRA, J.O. **Importância e potencial das associações micorrízicas para a agricultura**. Belo Horizonte, EPAMIG, 1985. 36p. (Documentos, 26).