

BENEFÍCIOS DA SUSPENSÃO DE CÉLULAS VEGETAIS PARA OS FUNGOS MICORRÍZICOS VESÍCULO-ARBUSCULARES *IN VITRO*.

III. EFEITOS DE DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO¹

MAURO AUGUSTO DE PAULA², JOSÉ EDUARDO BRASIL P. PINTO³,
JOSÉ OSWALDO SIQUEIRA⁴ e MOACIR PASQUAL³

RESUMO - Avaliaram-se os efeitos de diferentes meios de cultivo de células vegetais (B₅, LS, MS, SH, White) na presença e ausência de células de puerária *Pueraria phaseoloides* (Roxb.) Benth sobre a germinação e crescimento micelial de *Scutellospora heterogama*. O meio MS não diluído prolongou o período de viabilidade das células, e quando diluído dez vezes (0,1 x MS), e com adição de células obtidas de hipocótilo de puerária promoveu os maiores benefícios para a germinação e ramificação do micélio de *Gigaspora gigantea*, *Gigaspora margarita* e *Scutellospora heterogama*. Apesar do crescimento micelial abundante, em nenhum meio de cultivo com adição de células foram verificados sinais visuais de colonização das células ou esporulação dos fungos micorrízicos VA.

Termos para indexação: Puerária, crescimento micelial, hipocótilo, germinação.

BENEFITS OF PLANT CELL SUSPENSION TO VESICULAR-ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI *IN VITRO*. III. EFFECTS OF DIFFERENT CULTURE MEDIUM

ABSTRACT - The effects of different culture medium of plant cells (B₅, LS, MS, SH and White) were evaluated in the presence or absence of *Pueraria phaseoloides* (Roxb.) Benth cells upon germination and growth of mycelium of *Scutellospora heterogama*. Nondiluted MS medium extended the viability period of cells and at ten times (0,1X MS) dilution and addition of cells from *Pueraria* hypocotyls promoted the greatest benefit to germination and ramification of the mycelium of *Gigaspora gigantea*, *Gigaspora margarita* and *Scutellospora heterogama*. Despite the significant mycelium growth, colonization or sporulation by the VAM fungi in the culture medium containing plant cells were not observed.

Index terms: *Pueraria*, growth of mycelium, hypocotyls, germination.

INTRODUÇÃO

Células vegetais possuem elevado requerimento nutricional para seu crescimento *in vitro*, exigindo meios bastante ricos em nu-

trientes (Street 1973 e Wilson et al. 1971). Apesar de o meio MS (Murashige & Skoog 1962) ser utilizado na maioria dos estudos com suspensão de células, estas também podem ser obtidas em diferentes meios de cultivo como meio B₅ (Gamborg et al. 1968), meio LS (Linsmaier & Skoog 1965), meio SH (Schenk & Hildebrandt 1972) e meio White (White 1963), sendo que esses apresentam composição qualitativa e quantitativa bastante diferentes.

Tanto a germinação quanto o crescimento micelial de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares (FMVA) são estimulados pela presença de células vegetais obtidas *in vitro* (Carr et al. 1985 e Paula et al. 1990a). No entanto,

¹ Aceito para publicação em 20 de dezembro 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), Km 47, Rio-São Paulo, CEP 23851 Seropédica, RJ. Bolsista do CNPq.

³ Eng. - Agr., Ph.D. e D.Sc., respectivamente, Prof. - Adj., ESAL, Dep. de Agricultura. Bolsista do CNPq.

⁴ Eng. - Agr., Ph.D., Prof. - Adj., ESAL, Dep. de Ciência do Solo. Bolsista do CNPq.

ao contrário do que é verificado para células vegetais (Street 1973), o crescimento do fungo é inibido pela presença de elevadas concentrações de nutrientes orgânicos e minerais (Hepper 1984 e Siqueira 1987). A formulação de meios de cultura capazes de prolongar a viabilidade de células e permitir o crescimento micelial dos FMVA pode contribuir para o esclarecimento dos fatores nutricionais requeridos para o crescimento, permitindo o estabelecimento de cultura axênica e esporulação destes importantes agentes promotores do crescimento vegetal *in vitro*.

Neste trabalho foram avaliados os efeitos de diferentes meios de cultivo na germinação e crescimento micelial de esporos de FMVA na presença de células de puerária *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Calos e suspensão de células de hipocótilo e radícula de puerária (*Pueraria phaseoloides* (Roxb.) Benth) foram obtidas conforme Paula et al. (1990b). Azigósporos de *Gigaspora margarita* (Becker & Hall), *Gigaspora gigantea* (Nicolson & Gerdemann) Gerdemann & Trappe e *Scutellospora heterogama* Walker & Sanders foram extraídos 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 dois minutos a 2.000 rpm, lavados em água destilada e selecionados pelo uso de microscópio (40X) quanto a sua morfologia e ausência de germinação. Posteriormente, em capela de fluxo laminar, os azigósporos 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 seis minutos, seguido de lavagens sucessivas com água destilada e autoclavada.

Os ensaios envolvendo azigósporos de FMVA – células vegetais – foram conduzidos em placas de 60 mm de diâmetro, contendo 20 ml de meio (água, nutrientes e 7 g/l de ágar Difco-purificado, pH 6,4), adicionando os azigósporos no centro da placa e aplicando-se ao seu redor as células vegetais, utilizando-se pipetadores automáticos.

Sendo o meio MS mais utilizado na obtenção de suspensão de células, no primeiro ensaio avaliaram-se os efeitos de diversas concentrações desse meio (ágar-água-0; 0,1X; 0,2X; 0,3X e MS não di-

luído - 1), na presença e ausência de 500 células obtidas de calos de hipocótilo de puerária, em 45 µl de sacarose 0,2%, com seis dias de incubação e viabilidade em torno de 70%, sobre a germinação e crescimento micelial de azigósporos de *G. gigantea*, *G. margarita* e *S. heterogama*. No segundo ensaio, avaliaram-se os efeitos de suspensão de células originadas de calos de hipocótilo e radícula de puerária, sobre a germinação e crescimento de *S. heterogama*, utilizando-se as mesmas concentrações do meio MS do ensaio anterior, na presença e ausência de 500 células, em 45 µl de sacarose 0,2%, com seis dias de incubação e viabilidade em torno de 80%. Para verificar a viabilidade de células utilizadas nesse ensaio, nas diversas concentrações do MS testadas, em função do tempo de incubação, conforme descrito em Paula et al. (1990a), amostras de no mínimo 200 células, com quatro repetições, foram avaliadas pelo teste de redução do iodonitrotetrazolium violeta - INT (Carr et al. 1985). No terceiro ensaio, meios de cultivo de células, como B5 (Gamborg et al. 1968), LS (Linsmaier & Skoog 1965), MS (Murashige & Skoog 1965), SH (Schenk & Hildebrandt 1972), WH (White 1963), foram testados na concentração de 0,1X (diluído dez vezes), na presença e ausência de 500 células obtidas de calos de hipocótilo de puerária, em 45 µl de sacarose 0,2%, com seis dias de incubação e viabilidade em torno de 70% na germinação e crescimento micelial de *S. heterogama*. Como controle utilizou-se meio ágar-água sem células e com adição de 45 µl de sacarose 0,2%.

Todos os ensaios, repetidos pelo menos duas vezes, e os tratamentos, apresentando no mínimo cinco repetições, foram dispostos no delineamento inteiramente casualizado. Após a aplicação dos tratamentos, as placas e frascos foram vedados com fita de plástico autocolante e mantidos em estufa a 25°C no escuro. Os ensaios foram conduzidos até a paralisação do crescimento micelial, verificado pelo surgimento de septos e redução ou interrupção dos movimentos citoplasmáticos bidirecionais (cicloso) observados nas hifas, conforme relatado por Sward (1981). Avaliaram-se a taxa de germinação e o crescimento micelial, sendo este estimado pelo número de pontas de hifa, interseções de hifas em placas quadriculadas, número de células auxiliares e categoria de crescimento, conforme Paula et al. (1990a).

Os resultados de percentagem de germinação, contagens de pontas de hifa e interseções em placas quadriculadas, foram submetidos a análise de variância e teste de médias usando as transformações de $Y = \arcsin \sqrt{X/100}$ e $Y = \sqrt{t + 0,5}$, quando

X se referia a percentagem e t, aos dados de contagem. A apresentação e discussão dos resultados foram feitas segundo a análise de variância dos fatores e suas interações.

RESULTADOS

As concentrações do meio MS e a presença de células de puerária influenciaram significativamente a germinação de *G. margarita*, *G. gigantea* e *S. heterogama* (Tabela 1). Para *G. margarita*, na ausência de células, a germinação foi maior nas concentrações de 0,1 e 0,2X MS, enquanto que na presença de células essa variável não diferiu entre as concentrações do MS, sendo, no entanto, superior aos trata-

mentos controle sem células, 0,3X MS e MS. Os tratamentos pouco influenciaram a germinação de *G. gigantea*, que se mostrou elevada mesmo no controle. A taxa de germinação desta espécie apresentou-se superior às demais, tanto na presença como na ausência de células, nos meios ágar-água, 0,3X MS e MS, não diferindo nos outros meios. Para *S. heterogama*, na ausência de células, a maior germinação foi obtida com 0,1X MS, e na presença, essa variável não diferiu entre as concentrações do MS, à exceção do MS, que apresentou a menor taxa de germinação. A adição de células aumentou a germinação de *S. heterogama* nos meios ágar-água, 0,2X e 0,3X Ms, não diferindo nos demais.

O número de pontas de hifas de *G. marga-*

TABELA 1. Médias¹ de germinação, número de pontas de hifas e medianas de crescimento micelial de zigósporos de *G. margarita*, *G. gigantea* e *S. heterogama* em diferentes concentrações do meio Murashige & Skoog (MS) na presença e ausência de suspensão de células de puerária. Baseado em 5 repetições.

| Meio | <i>G. margarita</i> | | <i>G. gigantea</i> | | <i>S. heterogama</i> | |
|-----------|---------------------------------------|----------|--------------------|---------|----------------------|---------|
| | s/cel | c/cel | s/cel | c/cel | s/cel | c/cel |
| | Taxa de germinação (%) | | | | | |
| Ágar-água | 44 abBy | 59 aAy | 97 aAx | 98 aAx | 14 bBy | 57 aAy |
| MS | 0 cBz | 57 aAy | 75 aAx | 79 aAx | 22 abAy | 7 bAy |
| 0,3X MS | 15 cBy | 62 aAy | 78 aAx | 97 aAx | 37 abBy | 74 aAy |
| 0,2X MS | 63 aAx | 65 aAx | 62 bAx | 92 aAx | 35 abBx | 72 aAx |
| 0,1X MS | 63 aAx | 78 aAx | 80 abAx | 96 aAx | 59 aAx | 75 aAx |
| | Pontas de hifa, n ^o /placa | | | | | |
| Ágar-água | 10 bBy | 33 abAy | 41 abAx | 60 abAx | 8 dBy | 31 abAy |
| MS | 4 bAy | 11cAy | 29 bAx | 34 bAx | 10 cdAy | 4 cAy |
| 0,3X MS | 8 abBy | 23 abcAy | 50 abAx | 53 abAx | 32 abAx | 14 bcBy |
| 0,2X MS | 15 abAx | 19 bcAy | 31 bBx | 60 abAx | 24 bcAx | 34 abAy |
| 0,1X MS | 18 aBy | 43 aAy | 58 aAx | 76 aAx | 49 aAx | 53 aAx |
| | Categoria de crescimento | | | | | |
| Ágar-água | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 |
| MS | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 0,3X MS | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 |
| 0,2X MS | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| 0,1X MS | 2 | 3 | 2 | 4 | 2 | 4 |

¹ As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%: as letras a, b, c são usadas para comparar meio; as letras A e B para comparar tratamentos com célula e as letras x, y, z para espécie de fungo.

rita foi superior na concentração de 0,1X MS, tanto na presença como na ausência de células. Além disso, a adição de células aumentou o número de pontas de hifas nos meios ágar-água, 0,1X MS e 0,3X MS, não diferindo nos outros tratamentos (Tabela 1). Em *G. gigantea*, a maior produção de hifas ocorreu no 0,1X MS, e a adição de células apenas favoreceu significativamente essa variável no 0,2X MS (Fig. 1). Também para essa variável, *G. gigantea* apresentou-se superior às demais espécies, principalmente nos meios ágar-água, 0,3X MS e MS. Para *S. heterogama* o maior número de pontas de hifas foi obtido com 0,1X MS, tanto na presença quanto na ausên-

cia de células. Observa-se, ainda, para essa espécie, que a adição de células aumentou o número de pontas de hifas no meio ágar-água, reduziu no 0,3X MS, e não apresentou diferenças nos demais.

Suspensão de células originadas de calos de hipocótilo e radícula de puerária, em meio com ágar contendo diferentes concentrações do meio MS, aumentaram a germinação e crescimento de *S. heterogama* (Tabela 2 e Fig. 2). Observa-se que os zigósporos apresentaram maior germinação em meio 0,1X MS, na presença de células obtidas de hipocótilo de puerária (Fig. 2). As menores taxas de germinação foram obtidas na ausência de células e com células de

radícula, nos meios ágar-água e MS. O número de pontas de hifas também foi bastante influenciado pelos tratamentos, sendo superior em meio 0,1X MS, porém não diferindo com a adição de células de hipocótilo e radícula (Tabela 2). Em meio ágar-água, 0,3X MS e MS, os tratamentos sem células não diferiram em relação aos tratamentos com células, sendo no entanto, inferiores aos mesmos nos 0,1X MS e 0,2X MS. O crescimento micelial foi maior em meio 0,1X MS com células de hipocótilo, onde ocorreu também o maior número de células auxiliares. Em meio MS, apesar de o crescimento micelial, mesmo na presença de células, não ter



FIG. 1. Células vegetais em suspensão obtidas a partir de calos de hipocótilo de puerária em meio MS (400X) (A) e crescimento micelial de zigósporos de *Gigaspora gigantea* (200X) na presença (B) e ausência de células vegetais (C).

ferido do controle, o surgimento de septos ocorreu aos 21 dias, evidenciando seu efeito inibitório. Nos demais tratamentos, a paralisação do crescimento somente foi observada aos 45 dias após a inoculação.

A origem das suspensões de células e as concentrações do meio MS influenciaram as taxas de viabilidade das células (Fig. 3), sendo que tanto aquelas originadas de calos de hipocótilo como de radícula, com o aumento do tempo de incubação apresentaram redução linear na viabilidade. Aos cinco dias, nos meios

TABELA 2. Médias¹ de número de pontas de hifa e mediana de número de células auxiliares e crescimento micelial de *S. heterogama* em diferentes concentrações do meio Murashige & Skoog (MS) na ausência (s/cel) e presença de células de hipocótilo (cel hip), radícula de puerária (cel rad). Baseado em 5 repetições.

| Meio | Células | | |
|-----------|------------------------------|---------|---------|
| | s/cel | cel hip | cel rad |
| | Pontas de hifa, n°/placa | | |
| Ágar-água | 14 bcA | 17 bcA | 21 bA |
| MS | 8 cA | 10 cA | 9 cA |
| 0,3X MS | 22 abA | 25 bA | 27 bA |
| 0,2X MS | 20 abB | 27 bA | 34 bA |
| 0,1X MS | 30 aB | 53 aA | 68 aA |
| | Categoria de crescimento | | |
| Ágar-água | 1 | 1 | 2 |
| MS | 1 | 1 | 1 |
| 0,3X MS | 1 | 2 | 2 |
| 0,2X MS | 2 | 2 | 2 |
| 0,1X MS | 2 | 4 | 3 |
| | Células auxiliares, n°/placa | | |
| Ágar-água | 0 | 2 | 5 |
| MS | 0 | 0 | 0 |
| 0,3X MS | 0 | 0 | 0 |
| 0,2X MS | 0 | 0 | 0 |
| 0,1X MS | 7 | 14 | 9 |

¹ As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%; as letras minúsculas são usadas para comparar meio e as maiúsculas, para tratamentos de célula.

0,2X MS, 0,3X MS e MS, células de hipocótilo e radícula apresentaram viabilidade entre 45-60 e 27-43%, respectivamente. Em meio 0,1X MS, por até quatro dias a viabilidade manteve-se em torno de 35 e 30% para células de hipocótilo e radícula, respectivamente. As células de radícula perderam a viabilidade mais rapidamente, sendo observado, inclusive, escurecimento do conteúdo citoplasmático.

A taxa de germinação da *S. heterogama*, não diferiu entre os diferentes meios de cultivo de células testadas, sendo, no entanto, todos os meios, superiores ao controle (Tabela 3). Não foram observadas interações significativas entre células e meios de cultivo testados; no entanto, as maiores taxas de germinação, independentemente do meio de cultivo, foram obtidas na presença de células, onde também se verificou maior número de pontas de hifa, que pouco diferiu entre os meios de cultivo, exceção do meio 0,1X LS que apresentou os mesmos valores, mas ainda superou o controle (Tabela 3). A adição de células também favoreceu o crescimento micelial, principalmente nos meios 0,1X MS, 0,1X B5 e 0,1X SH, onde foram verificadas as maiores categorias de crescimento e a maior ocorrência de células auxiliares. Além disso, nesses meios o surgimento de septos e paralisação do

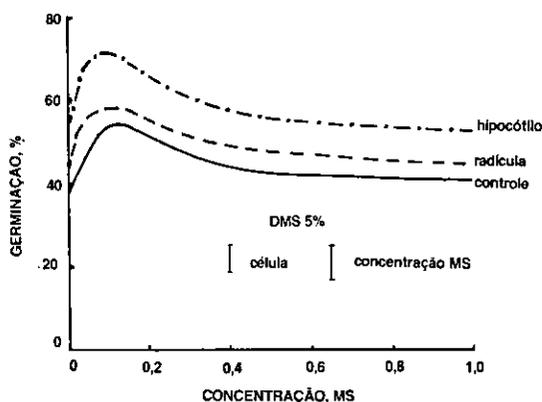


FIG. 2. Efeito de concentrações do meio Murashige & Skoog (MS) e da adição de suspensão de células obtidas de hipocótilo e radícula de puerária, na germinação de *Scutellospora heterogama*.

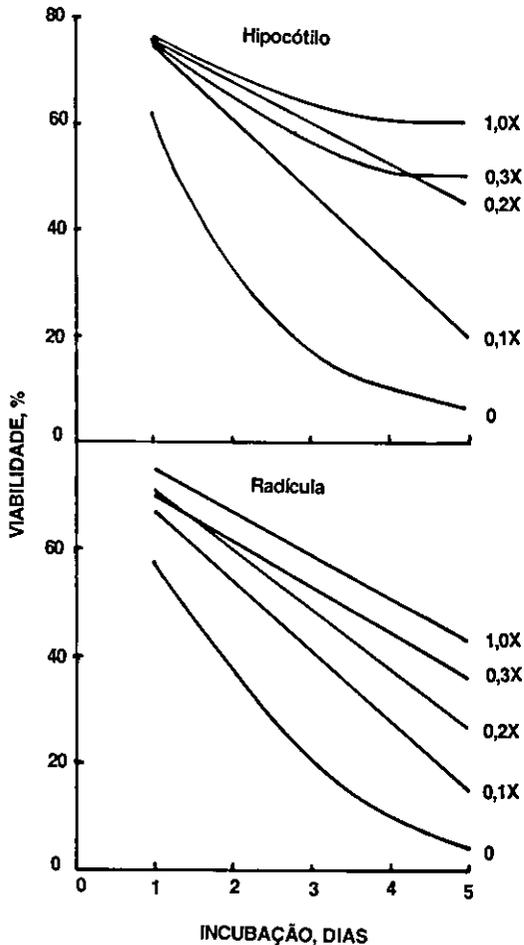


FIG. 3. Viabilidade pela redução do INT, de células obtidas de calos de hipocótilo e radícula de puerária em diferentes concentrações do meio MS.

crescimento somente ocorreram aos 40 dias após a inoculação, sendo que nos demais e no controle, isso ocorreu aos 30 e 21 dias, respectivamente.

DISCUSSÃO

Para as três espécies de FMVA em estudo, o maior crescimento micelial obtido foi no tratamento com 0,1X MS, que também se mostrou benéfico para o crescimento desses fungos em estudos realizados por Carr et al.

(1985) e Miller-Wideman & Watrud (1984). No entanto, nessa concentração do MS, os efeitos apresentaram maior magnitude quando na presença de células de puerária. *S. heterogama* e *G. gigantea* apresentaram crescimento superior ao de *G. margarita* e todos com características bastante distintas. Os tubos germinativos de *G. margarita* e *S. heterogama* cresceram linearmente em relação à superfície do meio, ramificando-se muito quando imersos neste. As células auxiliares foram produzidas apenas no ágar-água e no 0,1X MS, sendo superior nesse último (dados não apresentados). *S. heterogama* apresentou maior número de células auxiliares à superfície do meio, enquanto que *G. margarita* e *G. gigantea* em micélio crescendo imerso no meio. *G. gigantea* apresentou germinação múltipla, conforme já relatado para essa espécie por Koske (1981), sendo que o tubo germinativo ramificou-se imediatamente após a emergência, em três a quatro hifas, que imergiram no ágar (Fig. 1). Tubo germinativo aéreo foi observado apenas em *G. gigantea* em meio ágar-água e 0,1X MS com células, sugerindo um estímulo quimiotrópico a compostos voláteis presentes no meio, conforme também relatado para essa espécie em meio com cultura de raízes (Gemma & Koske 1988).

O surgimento de septos e paralisação de crescimento no meio 0,1X MS com células, para as três espécies de FMVA, ocorreu aos 45 dias após a inoculação, enquanto que nos demais tratamentos, a partir de 21 dias. No tratamento meio MS com e sem células, o micélio apresentou septos mais frequentes e paralisação do crescimento relativamente mais rápida, com intensa formação de vacúolos e aborto de ramificações de hifas. Isso possivelmente pode estar associado às elevadas concentrações de nutrientes no meio não diluído e aumento na quantidade de compostos exsudados pelas células neste meio, que atuaram inibindo o crescimento micelial.

O maior crescimento micelial obtido em meio 0,1X MS com células de hipocótilo pode estar associado a maior viabilidade dessas células em relação as obtidas de calos de radí-

TABELA 3. Médias¹ de germinação e pontas de hifas e medianas de células auxiliares e crescimento micelial de *S. heterogama* em diferentes meios de cultivo (0,1X) na ausência (s/cel) e presença (c/cel) de células de puerária. Baseado em 5 repetições.

| Meio | Germinação (%) | Ponta de hifas n°/placa | Categoria crescimento | Células auxiliares n°/placa |
|--|----------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| B ₅ - Gamborg, Miller & Ojima | 78 a | 49 ab | 3 | 11 |
| LS - Linsmaier & Skoog | 79 a | 46 b | 2 | 8 |
| MS - Murashige & Skoog | 73 a | 60 ab | 4 | 19 |
| SH - Schenk & Hildebrandt | 74 a | 62 ab | 3 | 13 |
| WH - White | 69 ab | 49 ab | 2 | 7 |
| Controle | 50 b | 33 c | 2 | 5 |
| Célula | | | | |
| - Ausente | 64 B | 41 B | 2 | 5 |
| - Presente | 77 A | 59 A | 3 | 11 |

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

cula. Essas diferenças no crescimento e viabilidade das células, segundo Wilson et al. (1971), podem estar relacionadas às características intrínsecas do explante e dos calos de origem e ao não-suprimento das exigências nutricionais para a maximização do crescimento *in vitro*. As características de viabilidade de células, composição bioquímica possivelmente diferenciada e as conseqüentes alterações qualitativas e quantitativas nos compostos estimulantes, podem ter determinado as respostas diferenciadas de micélio de *S. heterogama* a adição de células de hipocótilo e raícula de puerária.

O maior crescimento micelial obtido nos meios 0,1X MS, 0,1X B₅ e 0,1X SH principalmente com adição de células, possivelmente deveu-se a um balanço mais adequado dos nutrientes utilizados em suas composições. Isso além de ter influenciado diretamente o crescimento da *S. heterogama*, pode ter permitido a manutenção da viabilidade das células por maior período. Apesar desses benefícios obtidos, em nenhum dos tratamentos foram verificados indícios de hifas colonizando células, sendo que em alguns casos foi possível observar hifas com crescimento em sentido

oposto às células. Essas características de crescimento podem ter sido determinadas pela presença de compostos voláteis e boa difusão de metabólitos exsudados pelas células, conforme também relatado por Carr et al. (1985).

Em nenhum meio com adição de células foram verificados sinais de colonização das células ou mesmo indícios de esporulação dos FMVA estudados. No entanto, os resultados obtidos mostram que estudos visando prolongar a manutenção de células vegetais viáveis no meio de cultivo, juntamente à adição de outros fatores estimulantes do crescimento micelial, poderão contribuir para incrementar o crescimento do FMVA *in vitro*.

CONCLUSÕES

1. Os maiores benefícios para a germinação e crescimento micelial de esporos de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares foram obtidos em meio MS, diluído dez vezes, e com adição de células de hipocótilo de puerária.

2. Meio MS não diluído, apesar de prolongar o período de viabilidade das células de puerária, apresentou efeitos inibitórios para a germinação e crescimento micelial.

3. As diluições no meio MS promoveram redução linear na viabilidade de células em função do tempo de incubação, sendo esse efeito mais acentuado em células obtidas de calos de radícula de puerária.

REFERÊNCIAS

- 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.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, New York, **50**:148-51, 1968.
- GEMMA, J.N. & KOSKE, R.E. Pre-infection interactions between roots and the mycorrhizal fungus *Gigaspora gigantea*: chemotropism of germ-tubes and root growth response. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, London, **91**:123-32, 1988.
- GERDEMANN, J.W. & NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, London, **46**:235-44, 1963.
- HEPPER, C.M. Regulation of spore germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora laevis* by soil pH. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, London, **83**:154-6, 1984.
- KOSKE, R.E. *Gigaspora gigantea*: observations on spore germination of a VA-mycorrhizal fungus. *Mycologia*, New York, **73**(2):288-300, 1981.
- LINSMAIER, E.M. & SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, Copenhagen, **18**:100-27, 1965.
- MILLER-WIDEMAN, M.A. & WATRUD, L.S. Sporulation of *Gigaspora margarita* on root culture of tomato. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, **30**:642-6, 1984.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, Copenhagen, **15**:473-97, 1962.
- 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.
- STREET, H.E. Cell (suspension) cultures: techniques. In: ———; 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**:667-673, 1981.
- WHITE, P.R. **The cultivation of animal and plant cells**. 2 ed. New York, Ronald, 1963. 228p.
- 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 of continuous culture of plant cell suspensions. *J. Exp. Bot.*, London, **21**:177-207, 1971.
- PAULA, M.A.; SIQUEIRA, J.O.; PINTO, J.E.B.P.; PASQUAL, M. Benefícios da suspensão de células vegetais para os fungos micorrízicos vesículo-arbusculares *in vitro*. I. Efeito da espécie vegetal e da idade das células. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, **25**(8):1101-1108, ago. 1990.
- 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.
- SCHENK, R.V. & HILDEBRANDT, A.C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.*, Ottawa, **50**:199-204, 1972.