

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

II. EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO E DA VIABILIDADE DAS CÉLULAS¹

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

RESUMO - Estudaram-se os efeitos da adição de 0, 500, 1.000, 1.500, 3.000 e 6.000 células vegetais de puerária por 20 ml de meio e da viabilidade das mesmas sobre a germinação e crescimento micelial dos fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em meio ágar-água e líquido. Os maiores benefícios, tanto para a germinação, quanto para crescimento micelial, foram obtidos com a adição de 500 células viáveis de puerária. A adição, ao meio, de células mortas não exerceu efeito significativo sobre os esporos, do que se infere que os benefícios das células vegetais sobre a germinação e crescimento micelial dependem da sua atividade metabólica. A presença de células viáveis não estimulou o crescimento independente do micélio destacado dos esporos.

Termos para indexação: germinação, crescimento micelial, ágar, puerária, esporos.

BENEFITS OF PLANT CELL SUSPENSION ON VESICULAR-ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI *IN VITRO*.

II. EFFECTS OF CELL CONCENTRATION AND CELL VIABILITY

ABSTRACT - The effects of addition of 0, 500, 1,000, 1,500, 3,000 and 6,000 of pueraria cell suspension per 20 ml of medium and cell viability on spore germination and germ tube growth of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi were studied in agar and liquid media. Additions of 500 viable pueraria cells gave the greatest benefits to either germination or mycelial growth. On the other hand, addition of the dead cells had no significant effects on the spores. This result indicates that the beneficial effects of plant cell suspension depend upon their metabolic activity. It was also found that the presence of viable plant cells did not stimulate independent growth of hyphae after detachment of the parent spore.

Index terms: germination, pueraria, spore, agar, mycelial growth.

INTRODUÇÃO

A adição de suspensão de células vegetais aos meios de cultivo estimula a germinação e

o crescimento micelial de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares (FMVA) *in vitro*, sendo estes benefícios variáveis de acordo com a espécie vegetal e idade das células (Carr et al. 1985 e Paula et al. 1990). Considerando-se que células vegetais cultivadas *in vitro* apresentam modificações em sua composição bioquímica – como: elevação nas concentrações de açúcares solúveis e proteínas (Phan et al. 1987), compostos fenólicos, etileno e outros produtos voláteis (Amino & Tazawa 1988 e Gamborg & La Rue 1968) –, estudos sobre os efeitos da concentração de células e da viabilidade destas sobre o crescimento dos FMVA podem contribuir para um melhor entendimento de seus efeitos benéficos e para o su-

¹ Aceito para publicação em 16 de novembro de 1989.

Extraído da Dissertação de Mestrado apresentada ao Dep. de Ciência do Solo, ESAL, pelo primeiro autor. Trabalho financiado pelo PADCT-FINEP-CNPq.

² Eng.-Agr., M.Sc., Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), Caixa Postal 37, CEP 37200 Lavras, MG. Bolsista do CNPq.

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

⁴ Eng.-Agr., Ph.D., D.Sc., respectivamente, Prof.-Adj., ESAL, Dep. de Agric. Bolsista do CNPq.

cesso do cultivo e multiplicação destes fungos na ausência de raízes vivas no laboratório.

Neste trabalho, foram avaliados os efeitos de concentrações e da viabilidade de células de puerária, na germinação e no crescimento micelial de esporos de FMVA.

MATERIAL E MÉTODOS

A obtenção de células de hipocótilo de puerária (*Pueraria phaseoloides* (Roxb.) Benth) e de azigósporos de *Gigaspora margarita* (Becker & Hall) e *Scutellospora heterogama*, (Walker & Sanders) de sinfestado foi feita conforme metodologia descrita em Paula et al. (1990). Foram conduzidos três experimentos, utilizando-se 20 ml de meio líquido (água, pH 6,4) ou ágar-água (7 g/l de ágar, pH 6,4) e frascos de vidro de 200 ml e placas-de-petri de 60 mm de diâmetro, respectivamente. Estes dois meios foram testados visando observar a interação FMVA-célula vegetal em diferentes condições de cultivo. Em meio ágar-água, os azigósporos foram adicionados à superfície no centro das placas, aplicando-se ao redor a suspensão de células de puerária, utilizando-se pipetadores automáticos, ao passo que, no meio líquido, adicionavam-se os azigósporos e em seguida a suspensão de células, de modo que houvesse imersão de ambos no meio.

No primeiro experimento, foram avaliados os efeitos da adição de 0, 500, 1.000, 1.500, 3.000 e 6.000 células de puerária, com seis dias de idade e viabilidade em torno de 80%, em 20 ml de meio, sobre a germinação e crescimento micelial de *G. margarita* e *S. heterogama*. Utilizaram-se, em todos os tratamentos, cinco repetições e um controle, sem célula, e adição de 45 µl de sacarose 0,2% (o veículo da suspensão de células).

No segundo experimento, avaliou-se a influência da viabilidade das células sobre o crescimento micelial de FMVA *in vitro*, utilizando-se os seguintes tratamentos: a) 500 células de puerária com seis dias de idade e viabilidade em torno de 80%; b) 500 células de puerária como em a, porém mortas por fervura em chama durante cinco minutos; c) controle, sem células mas com adição de 45 µl de sacarose 0,2%. As células foram adicionadas ao meio contendo azigósporos de *G. margarita*, sendo cada tratamento repetido sete vezes.

Em um terceiro experimento, avaliou-se a influência do destacamento do tubo germinativo de es-

poros pré-germinados de *G. margarita*, no crescimento micelial. O destacamento foi feito com auxílio de estiletos, dez dias após a incubação dos azigósporos, na presença e ausência de 45 µl de sacarose 0,2% contendo 500 células com seis dias de idade, obtidas de calos de hipocótilo de puerária e viabilidade em torno de 70%. Nos tratamentos sem células foram adicionados µl de sacarose 0,2%, e cada tratamento foi repetido quatro vezes.

Após a aplicação dos tratamentos, as placas e frascos foram vedados com fita de plástico autocolante e mantidos em condições de baixa umidade em estufa a 25°C no escuro. Os experimentos foram conduzidos até a paralisação do crescimento micelial, evidenciado pelo surgimento de septos e redução ou interrupção dos movimentos citoplasmáticos bidirecionais (ciclose) nas hifas (Siqueira 1987 e Sward 1981). As avaliações como número de pontas de hifas, intersecções em placa e categorias de crescimento foram feitas conforme Paula et al. (1990).

Os tratamentos de todos os experimentos foram delineados inteiramente ao acaso, sendo cada experimento repetido pelo menos duas vezes. Os resultados de percentagem de germinação, contagens de pontas de hifa e intersecções em placas com quadrículas, 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 a percentagem, e t, aos dados de contagem. A apresentação e discussão dos resultados foram feitas segundo a significância dos fatores e suas interações.

RESULTADOS

Experimento 1

Variações nas concentrações de células de puerária no meio ágar-água não influenciaram significativamente a taxa de germinação da *G. margarita* e *S. heterogama* (Tabela 1), mas diferenças significativas foram observadas no número de pontas de hifas tanto para células, quanto para espécie de FMVA (Fig. 1). Observou-se uma tendência de aumento da taxa de germinação na concentração de 500 células, com redução nas concentrações mais elevadas, embora essas diferenças não tenham sido significativas. Observa-se que, para ambas

TABELA 1. Médias de germinação de azigósporos¹ e medianas de categorias de crescimento e células auxiliares de *G. margarita* (mar) e *S. heterogama* (het) em meio ágar-água e de *G. margarita* em meio líquido (água) com diferentes concentrações de células. Baseado em 5 repetições.

Concentração de cél./20 ml de meio	Germinação (%)		Cat. de cresc.		Nº cél. auxiliares	
	mar	het	mar	het	mar	het
Meio ágar-água						
0	57 aA	69 aA	2	1	3	4
500	75 aA	79 aA	3	3	9	18
1.500	68 aA	65 aA	2	2	0	5
6.000	67 aA	60 aA	2	2	4	5
Meio líquido (água)						
0			1		0	
500			4		16	
1.000			3		9	
3.000			2		3	
6.000			2		0	

¹ As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%, sendo as letras minúsculas usadas para comparar concentrações de células, e as maiúsculas, para espécie de fungo MVA.

as espécies de FMVA, as taxas de germinação foram relativamente elevadas, inclusive no controle, sem células, sendo que *S. heterogama* foi superior à *G. margarita*. Possivelmente, a influência de células nesse caso foi menor pelo fato de os azigósporos apresentarem maior viabilidade e beneficiarem-se da sacarose no meio. Tanto para *G. margarita* quanto para *S. heterogama*, a adição de 500 células de puerária propiciou maior número de pontas de hifas, com redução nas concentrações mais elevadas (Fig. 1). Esta variável mostrou-se significativamente superior para *S. heterogama*, que apresentou também maior número de células auxiliares (Tabela 1). Tanto o número de células auxiliares quanto o crescimento mi-

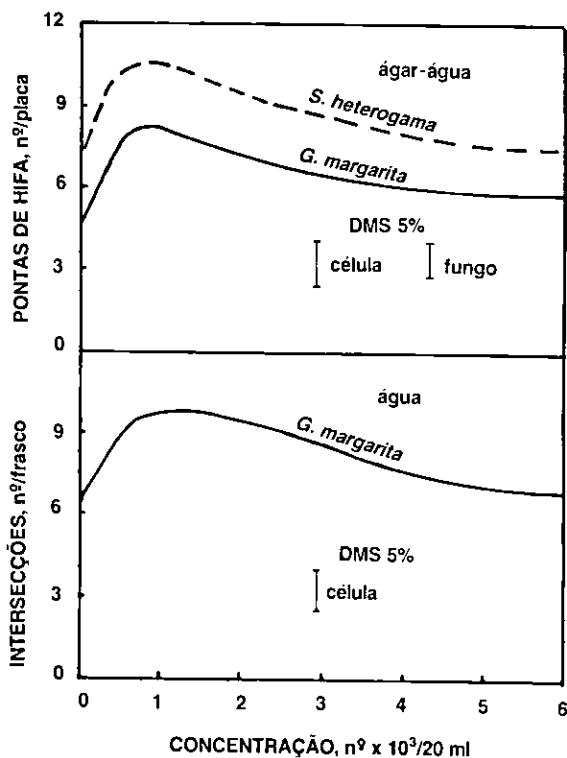


FIG. 1. Efeito de concentrações de células de puerária sobre o número de pontas de hifa de *Gigaspora margarita* e *Scutellospora heterogama* em meio ágar-água e crescimento micelial de *G. margarita* em meio líquido (água).

celial foram superiores com a adição de 500 células de puerária, independentemente da espécie de FMVA.

Em meio líquido, a concentração de 500 células também foi significativamente superior, para intersecções de hifas (Fig. 1), crescimento micelial, e número de células auxiliares da *G. margarita* (Tabela 1). Foi constatada a aderência de células às hifas, mas não foram observados indícios de colonização. Além disso, as células apresentaram sobrevivência mais favorecida, e a septação só ocorreu aos 40 dias.

Foi verificada correlação altamente significativa entre as variáveis intersecções e pontas

de hifas com as categorias de crescimento (Fig. 2). Os tratamentos que favorecem o crescimento apresentaram maior ramificação do micélio. Além disso, pontas de hifa e inter-

secções mostraram correlação significativa ($r = 0,96^{**}$), indicando que ambas são igualmente representativas do crescimento micelial dos FMVA *in vitro*.

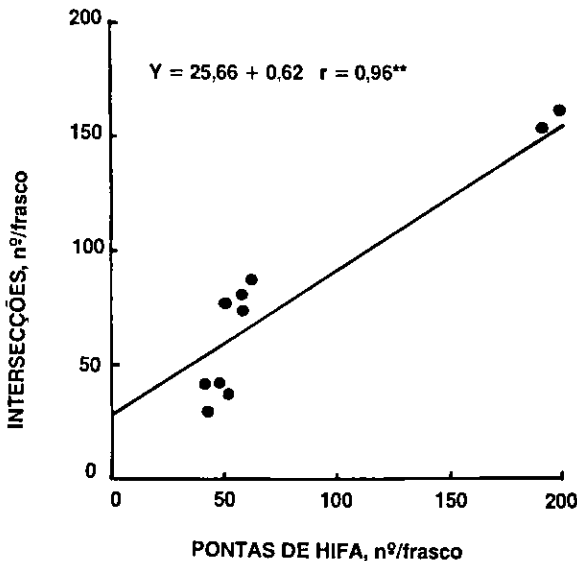
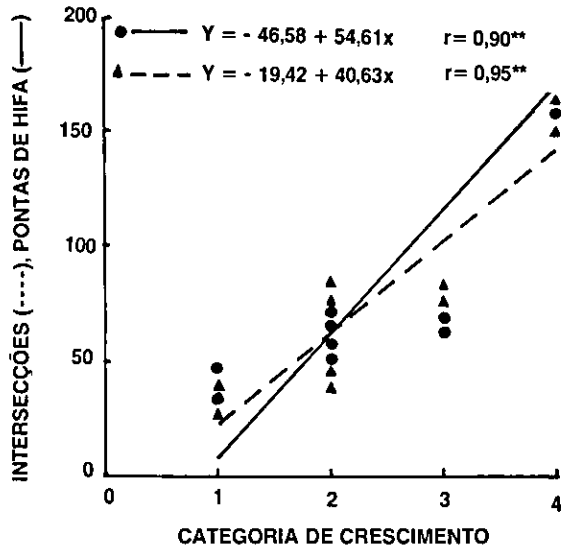


FIG. 2. Relação entre intersecções e pontas de hifas com categoria de crescimento (A) e intersecções com pontas de hifa (B) em *Gigaspora margarita*, em meio líquido (água) com adição de diferentes concentrações de células de puerária.

Experimento 2

Células de puerária viáveis e inviabilizadas por fervura podem influenciar o crescimento micelial de FMVA (Tabela 2). Em meio ágar-água, as taxas de germinação de esporos de *G. margarita* não apresentaram diferenças significativas com a adição de células viáveis e não-viáveis no meio de cultivo, porém o número de pontas de hifas, células auxiliares e crescimento micelial foram influenciadas significativamente pela viabilidade das células (Tabela 2). As células não-viáveis apresentaram-se desagregadas, amorfas e de coloração amarelo-escuro. Como também verificado nos experimentos com variações na concentração de células, características inerentes aos zigósporos, bem como maior potencial para germinação, podem ter contribuído para pequena influência das células vegetais na germinação dos esporos. No entanto, o número de pontas de hifas na presença de células viáveis apresentou-se significativamente superior aos tratamentos com células não-viáveis e ao controle, sem células, sendo que esses dois últimos tratamentos não diferiram significativamente entre si. O número de células auxiliares foi superior, com células viáveis, em comparação com células não viáveis, sendo que ambos foram superiores ao controle sem célula.

O número de pontas de hifas de *G. margarita* crescendo em meio líquido foi mais favorecido que em meio ágar-água, sendo significativamente maior na presença de células viáveis. O mesmo foi observado para intersecções de hifas, crescimento micelial e número de células auxiliares (Tabela 2).

Experimento 3

Azigósporos de *G. margarita* intactos e com os tubos germinativos destacados apresentaram crescimento diferenciado na presença

TABELA 2. Médias¹ de germinação de esporos e pontas de hifas e medianas de categorias de crescimento e células auxiliares de *G. margarita* em ágar-água e médias de pontas de hifas e interseções e medianas de categoria de crescimento e células auxiliares em meio líquido (água) com células viáveis e não viáveis de puerária, com base em 7 repetições.

Condições da célula	Germinação (%)	Pontas de hifas n°/placa	Cat. de crescimento	Cél. auxil. n°/placa	Pontas de hifas			
					Interseções n°/placas	Cat. crescimento	Cél. auxil. n°/frasco	
					Meio ágar-água		Meio líquido (água)	
Viável	68 a	142 a	3	17	74 a	126 a	3	12
Não-viável	57 a	50 b	2	10	49 ab	58 b	2	5
Sem célula	55 a	34 b	2	3	43 b	32 b	2	4

¹ As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

e ausência de suspensões de células de puerária (Fig. 3). Na presença de células, o número de pontas de hifas de zigósporos intactos foi maior que o verificado com tubos germinativos destacados, enquanto os tratamentos sem células apresentaram tendência semelhante, porém em menor magnitude. Tanto o crescimento micelial quanto o número de células auxiliares, também foram superiores no tratamento com células e zigósporos intactos (Fig. 3). Nesse tratamento, a septação ocorreu aos 35 dias após a inoculação, enquanto no tratamento sem células e tubo germinativo destacado ela foi verificada aos 15 dias.

A adição de células influenciou o crescimento micelial dos tubos germinativos intactos e destacados (Fig. 4). Observa-se que 82% dos zigósporos com tubos germinativos destacados, na ausência de células, apresentaram crescimento de categoria 1, enquanto que a adição de células aumentou a proporção de zigósporos com maior crescimento. Com tubo germinativo intacto, 67% dos zigósporos apresentaram categoria de crescimento 2 quando sem células, enquanto com adição de células, 75% destes se enquadravam na categoria 3.

DISCUSSÃO

A inibição no crescimento micelial em decorrência da elevação da concentração de células parece estar associada a um acúmulo de

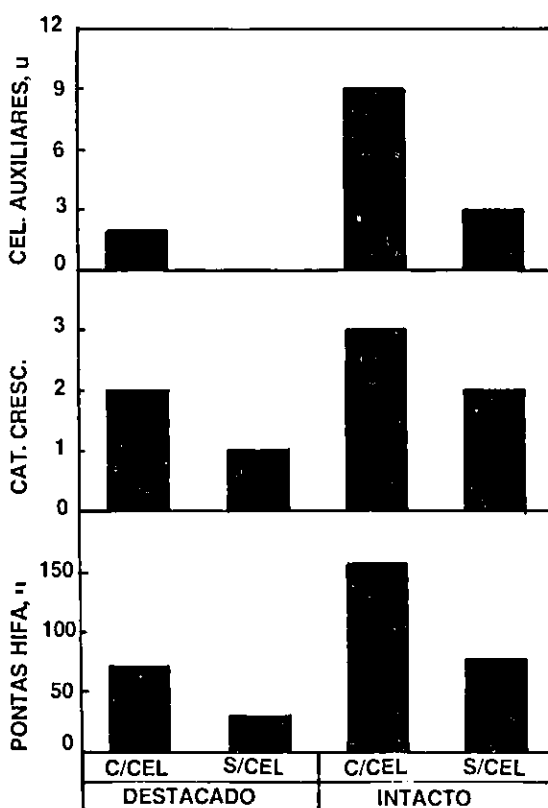


FIG. 3. Influência da adição de células de puerária no número de pontas de hifa, mediana para categoria de crescimento micelial e células auxiliares em *Gigaspora margarita* com tubos germinativos intactos e destacados.

metabólitos provenientes do metabolismo e maior exsudação de produtos secundários (Carr et al. 1985 e Amino & Tazawa, 1988). Além disso, variações na relação O_2/CO_2 podem também ter atuado limitando o crescimento (Le Tacon et al. 1983). Considerando-se que a produção de compostos fenólicos, etileno e outros produtos voláteis é comum em células cultivadas *in vitro* (Amino & Tazawa 1988, Carr et al. 1985 e Gamborg & La Rue 1968), a elevação de suas concentrações acima de um ponto ótimo que ocorre com 500 células poderia estar atuando desfavoravelmente, assim como ocorre com a concentração de exsudatos radiculares (Elias & Safir 1987).

O crescimento micelial foi mais favorecido em meio líquido do que em meio ágar-água. Isso possivelmente está associado a uma melhor difusão dos compostos estimulantes de crescimento provenientes das células vegetais e ao favorecimento da atividade metabólica e

produção de compostos secundários pelas mesmas em meio líquido (Amino & Tazawa 1988). Neste meio de cultivo, observou-se também grande número de células viáveis aderidas às hifas, especialmente naquelas que estavam imersas no meio. Porém, não foram verificados indícios de colonização ou formação de estruturas típicas do processo de infecção (Sward 1981). A aderência de células na superfície de hifas parece ser mais de natureza físico-química, podendo estarem envolvidas substâncias ligantes presentes na superfície de ambas, como já evidenciado para sistemas *in vivo* (Tisdall & Oades 1979), onde argilas e outros colóides aderem às hifas dos FMVA, devido à presença de substâncias com elevada viscosidade, possivelmente polissacarídeos, produzida por esses fungos.

Na presença de células viáveis verificou-se intensa septação das hifas aos 35 dias após a inoculação, indicando redução no cresci-

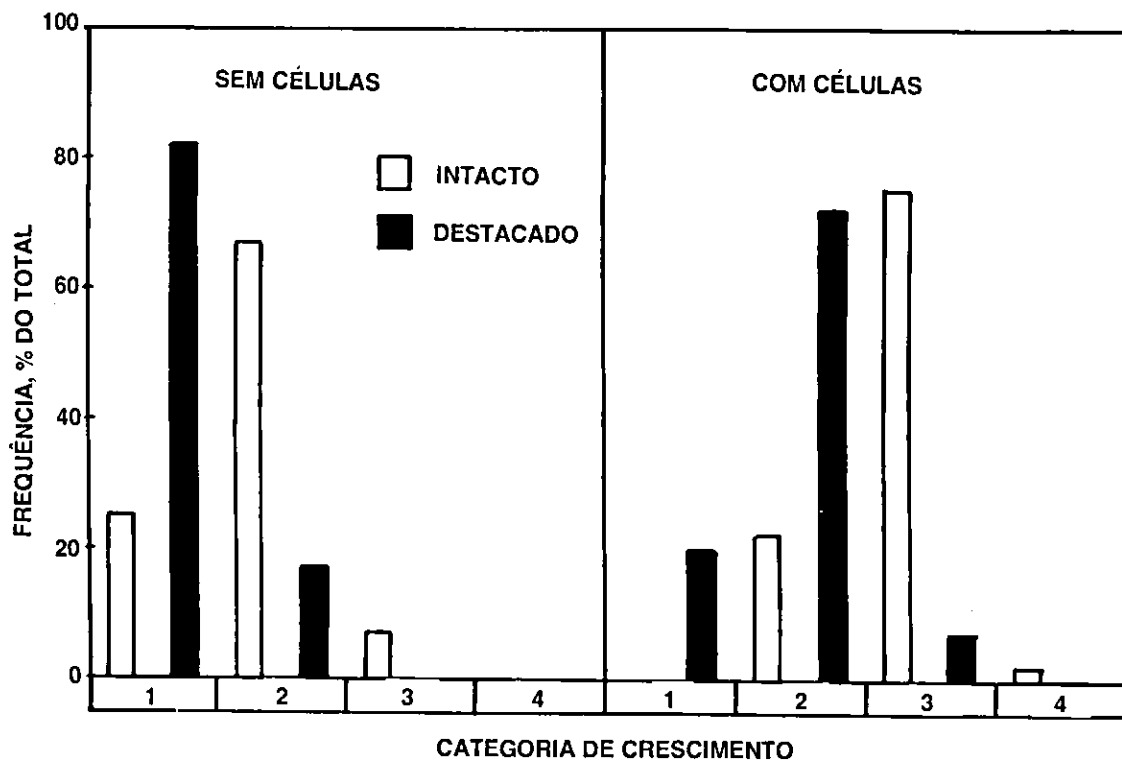


FIG. 4. Distribuição de frequência para categoria de crescimento de tubo germinativo de *Gigaspora margarita* intacto e destacado, na ausência e presença de células de puerária.

mento micelial em face do não-suprimento de todas as exigências nutricionais para o crescimento contínuo e esporulação. Contudo, tanto na presença de células não-viáveis, quanto no controle sem células, a septação ocorreu aos 25 dias, verificando-se ainda incidência de hifas abortadas, nestes últimos tratamentos. Conforme Godfrey (1957), os FMVA necessitam de células metabolicamente ativas para seu crescimento e esporulação. Neste experimento, as células viáveis adicionadas ao meio perderam a viabilidade após três dias de cultivo, o que pode também ter atuado limitando o crescimento micelial. Certos compostos produzidos pelas células vegetais que parecem responsáveis por este estímulo são ainda de natureza pouco conhecida, mas são essenciais para o crescimento contínuo destes simbiotróficos obrigatórios *in vitro* (Siqueira 1987). Com a adição de células de puerária mortas por fervura, *G. margarita* apresentou crescimento relativamente menor, devido, possivelmente, à paralisação do metabolismo e produção dos fatores estimulantes, nas células em crescimento. A desnaturação ou modificação dos fatores estimulantes pelo aquecimento também não podem ser descartadas.

Embora hifas de FMVA crescendo *in vitro* tenham crescimento limitado quando destacadas dos esporos, mesmo em meio enriquecido (Hepper 1983 e Mosse 1959 e 1970) a adição de células propiciou maior crescimento micelial dos tubos germinativos intactos e destacados. Isto mostra a superioridade dos benefícios das células viáveis no crescimento micelial, e indica um efeito somático da mobilização das reservas do zigósporo, com fatores estimulantes das células viáveis. Porém, não foi verificada regeneração dos zigósporos, quando o tubo germinativo foi destacado do zigósporo, característica comum a outras espécies, especialmente *Gigaspora gigantea* (Koske 1981).

O crescimento independente e a capacidade de absorção de nutrientes do meio são bastante deficientes no tubo germinativo dos zigósporos, mesmo em meios de cultivo com fatores estimulantes (Hepper 1983) ou células pre-

sentes (Carr et al. 1985). Diferenciação funcional no micélio pode estar envolvida, visto que diferenciações que ocorrem no micélio intra-radicular, como formação de arbúsculo, não ocorre em condições axênicas, e pode ser a única estrutura com permeabilidade suficiente para absorver e capacidade metabólica para assimilar determinados substratos e fatores nutricionais requeridos pelo fungo (Siqueira 1987). Além disso, certos fatores nutricionais fornecidos pela planta durante a simbiose podem não estar presentes mesmo em meio com células vegetais, somente sendo produzidos por raízes metabolicamente ativas. Estudos fisiológicos e bioquímicos mais detalhados visando isolar esses compostos estimulantes de crescimento em raízes, juntamente com os benefícios de células vegetais aqui relatados, podem contribuir para a obtenção de um meio de cultivo para os FMVA na ausência de raízes vivas.

CONCLUSÕES

1. A adição de 500 células de puerária em 20 ml de meio ágar-água ou líquido (água) proporcionou os maiores benefícios, tanto para a germinação quanto para o crescimento micelial.
2. A magnitude dos efeitos benéficos dependem da atividade metabólica (viabilidade) das células vegetais. Células mortas não exercem efeitos estimulantes para o crescimento.
3. A presença de células exerceu pequeno benefício para o crescimento, independentemente do tubo germinativo destacado do zigósporo.

REFERÊNCIAS

- AMINO, S.I. & TAZAWA, M. Uptake and utilization of sugars in cultured rice cells. *Plant cell Physiol.*, Kyoto, 29(3):483-7, 1988.
- CARR, G.R.; HINKLEY, M.A.; LE TACON, F.;
¹ 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.
- ELIAS, K.S. & SAFIR, G.R. Hyphal elongation of *Glomus fasciculatus* in response to root exudates. **App. Environ. Microb.**, Washington, 53(8):1928-33, 1987.
- GAMBORG, O.L. & LA RUE, T.A.G. Ethylene produced by plant cells in suspension cultures. **Nature**, London, 220:604-5, 1968.
- GODFREY, R.M. Studies on British species of *Endogone* III. Germination of spores. **Trans. Brit. Mycol. Soc.**, London, 40:203-10, 1957.
- HEPPER, C.M. Limited independent growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *in vitro*. **New Phytol.**, London, 93(4):537-42, 1983.
- KOSKE, R.E. *Gigaspora gigantea*: observations on spore germination of a VA-mycorrhizal fungus. **Mycologia**, New York, 73(2):288-300, 1981.
- LE TACON, F.; SKINNER, F.A.; MOSSE, B. Spore germination and hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Gerdemann and Trappe) under decreased oxygen and increased carbon dioxide concentrations. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, 29:1280-5, 1983.
- MOSSE, B. Culture of *Endogone*. **Rothamsted Experimental Station Annual report**, Harpenden, 1:97, 1970.
- MOSSE, B. The regular germination of resting spores and some observations on the growth requirements of an *Endogone* sp. causing vesicular-arbuscular mycorrhiza. **Trans. Brit. Mycol. Soc.**, London, 42:273-86, 1959.
- 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.
- 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. **Exp. Biol.**, 46(3):S8, 1987.
- 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.
- SWARD, R.J. The structure of the spores of *Gigaspora margarita*. III. Germ-tube emergence and growth. **New Phytol.** London, 88:667-73, 1981.
- TISDALL, J.M. & OADES, J.M. Stabilization of soil aggregates by the root systems of ryegrass. **Austral. J. Soil. Res.**, London, 17:429-41, 1979.