

EFEITOS DE CARBOIDRATOS E ÁCIDOS ORGÂNICOS SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL DO FUNGO ENDOMICORRÍZICO *GIGASPORA GIGANTEA IN VITRO*¹

LÚCIA REGINA CANGUSSU DA SILVA² e JOSÉ OSWALDO SIQUEIRA³

RESUMO - Estudaram-se os efeitos de compostos orgânicos sobre o crescimento micelial de *G. gigantea in vitro*. Esporos desinfestados e pré-germinados em ágar-água foram transferidos para meio líquido suplementado com 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 g/l de frutose, arabinose, sacarose, trealose, manitol ou amido, e 0,0; 0,156; 0,313; 0,625 e 1,250 g/l de pectina ou dos ácidos pirúvico, cítrico, oxálico e tartárico. Estudaram-se ainda os efeitos de períodos de pré-crescimento de 0, 10 e 20 dias sobre a resposta do fungo à adição de sacarose (4 g/l) ao meio. Dentre os vários carboidratos estudados, efeitos estimulatórios significativos foram obtidos somente quando se adicionou pectina em baixas concentrações. Trealose mostrou-se inibitória em todas as concentrações estudadas, enquanto nenhum dos demais carboidratos influenciou significativamente o crescimento. Efeitos estimulatórios de sacarose (4 g/l) foram obtidos quando ela foi adicionada após 10 ou 20 dias de incubação dos esporos pré-germinados. Para os ácidos orgânicos, efeitos estimulatórios significativos foram obtidos com os ácidos tartárico e cítrico, e inibição, com ácidos pirúvico e oxálico.

Termos para indexação: micorrizas, fungos micorrízicos, cultura axênica, biotrofismo, simbiose, esporos, nutrição de fungos.

EFFECTS OF CARBOHYDRATES AND ORGANIC ACIDS ON THE MYCELIAL GROWTH OF THE ENDOMYCORRHIZAL FUNGUS *GIGASPORA GIGANTEA IN VITRO*

ABSTRACT - The effects of organic compounds on the mycelial growth of *G. gigantea in vitro* were studied. Surface disinfested spores were germinated in water-agar and transferred to a liquid medium supplemented with 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 and 4,0 g/l of fructose, arabinose, sucrose, trehalose, mannitol or starch, and 0,0; 0,156; 0,313; 0,625 and 1,25 g/l of pectin or of pyruvic, citric, oxalic and tartaric acids. The effects of 0, 10 and 20 day pre-growth periods on the response of the fungus to the addition of sucrose (4 g/l) were also studied. For the carbohydrates, significant stimulatory effects were only obtained with low concentrations of pectin. Trehalose was inhibitory to growth in all concentrations studied, while the remaining carbohydrates had no significant effects on growth. Stimulatory effects for sucrose (4 g/l) were obtained when it was added after 10 or 20 days incubation of the pre-germinated spores. For the organic acids, stimulatory effects were obtained with the tartaric and citric acids, and inhibition, with the pyruvic and oxalic acids.

Index terms: mycorrhizae, mycorrhizal fungi, axenic culture, biotrophism, symbiosis, fungal nutrition, spores.

INTRODUÇÃO

Os efeitos benéficos dos fungos micorrízicos vesículo-arbusculares (MVA) na nutrição mineral e desenvolvimento das plantas hospedeiras são inquestionáveis. Porém, o seu emprego em larga escala é ainda restrito, em face das dificuldades encontradas na produção de inóculo, pois os fungos MVA são biotróficos

¹ Aceito para publicação em 19 de junho de 1991.

Extraído da Dissertação de Mestrado apresentada ao Dep. de Ciência do Solo, ESAL, pela autora. Financiado pelo PADCT/FINEP.

² Bióloga, M.Sc., Rua Dr. Paulo Florence, 492-25, CEP 13033 Campinas, SP. Bolsista da CAPES.

³ Eng.-Agr., Ph.D., Prof.-Adj., Dep. de Ciência do Solo, Esc. Sup. de Agric. de Lavras (ESAL), Caixa Postal 37, CEP 37200 Lavras, MG.

obrigatórios e ainda não foram cultivados em laboratório na ausência de raízes vivas (Hepper 1984b).

Na tentativa de superar as dificuldades impostas pelo biotrofismo, vários estudos têm sido conduzidos para caracterização fisiológica e nutricional de fungos MVA. Esses estudos buscam basicamente a obtenção de meios de cultura capazes de sustentar o crescimento micelial *in vitro*, na ausência de raízes vivas. Dentre os compostos orgânicos adicionados a esses meios como fontes de carbono para o crescimento, efeitos estimulatórios são relatados para os carboidratos glicose e sacarose (Carr et al. 1985, Siqueira & Hubbell 1986 e Siqueira et al. 1982), para o ácido tartárico (Mosse 1959) e para exsudatos e extratos de vegetais (Elias & Safir 1987, Graham 1982 e Paula 1988).

Os estímulos proporcionados ao crescimento micelial por estes compostos orgânicos são, geralmente, de pequena magnitude (Hepper 1979), o que sugere que os fungos MVA apresentam baixa capacidade de absorção ou metabolização de fontes de carbono exógenas. Entretanto, os estudos de fisiologia das associações MVA indicam que esses fungos, quando em simbiose, são permeáveis a compostos orgânicos e capazes de incorporar o carbono absorvido em lipídios, ácidos orgânicos, carboidratos, aminoácidos, proteínas, polissacarídeos e nucleotídeos (Revege et al. 1975, Cox et al. 1975 e Maskall 1980), o que evidencia que as vias de absorção e metabolização de carbono são operantes no micélio ligado às raízes. Estudos sobre a fisiologia e nutrição de fungos MVA *in vitro* poderão contribuir para elucidar os fatores reguladores do metabolismo e crescimento micelial na ausência do hospedeiro.

No presente estudo avaliaram-se os efeitos da adição de diferentes concentrações de carboidratos e de ácidos orgânicos ao meio nutritivo sobre o crescimento micelial do fungo MVA *Gigaspora gigantea in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os esporos de *Gigaspora gigantea* (Nicolson & Gerdemann) Gerdemann & Trappe foram multiplicados em raízes de *Brachiaria decumbens* cultivada em vasos contendo Latossolo Roxo desinfestado com brometo de metila (260 cc/m³ de solo). Os vasos foram mantidos em casa de vegetação do Departamento de Ciência do Solo da ESAL, por 12-14 meses, sendo os esporos extraídos do substrato por peneiramento úmido, conforme sugerido por Gerdemann & Nicolson (1963), seguido de centrifugação em água por 3 minutos a 2.000 rpm, e em solução de sacarose 45% por 2 minutos a 3.000 rpm. Os esporos obtidos foram observados sob microscópio estereoscópico e descartados os que apresentavam coloração escura, lesões ou detritos aderidos à parede.

Em câmara asséptica de fluxo laminar, procedeu-se à desinfestação superficial dos esporos, conforme descrito por Colozzi-Filho (1988). Após desinfestação, os esporos foram transferidos, com o auxílio de pinça flexível e de ponta fina, para placas-de-petri contendo ágar-água 1% (pH 6,4±0,2). O ágar foi marcado com perfurador de rolha de 1 cm de diâmetro, colocando-se um esporo no centro de cada círculo demarcado. As placas foram incubadas em estufa 25-28°C, no escuro, por dois a três dias para germinação. Esporos germinados e assépticos, sem manchas escurecidas e com um ou mais tubos germinativos, de comprimento inferior a duas vezes o diâmetro do esporo, foram utilizados nos experimentos.

Utilizou-se um meio nutritivo líquido modificado de Hepper (1979), contendo (mg/l): KCl, 4,0; KNO₃, 6,40; MgSO₄ · 7H₂O, 4,0; Ca (H₂PO₄)₂ · H₂O, 0,8; Fe Na EDTA, 0,19; tiamina, 0,40; biotina, 0,04 e cianocobalamina, 0,04. O pH foi acertado para 5,5±0,2 com NaOH 1N ou HCl 0,1 M antes da autoclavagem. As soluções de vitaminas e de fontes de carbono foram esterilizadas separadamente.

Para determinação dos efeitos de compostos orgânicos sobre o crescimento micelial, os esporos pré-germinados foram transferidos para tubos de ensaio contendo 3 ml do meio nutritivo suplementado com 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 g/l dos carboidratos frutose, arabinose, sacarose, trealose, manitol e amido e 0,0; 0,156; 0,313; 0,625 e 1,25 g/l de pectina ou dos ácidos pirúvico, cítrico, oxálico e tartárico. Cada tratamento foi constituído por 30 tubos de ensaio contendo um único esporo, sendo a parcela experimental

constituída por dez tubos. Os tubos foram incubados por 15 dias a 25-28°C, no escuro.

Para determinação dos efeitos de períodos de pré-crescimento em meio nutritivo sobre a utilização subsequente de fonte de carbono exógena, esporos pré-germinados foram incubados em tubos de ensaio contendo 3 ml de meio nutritivo, procedendo-se à adição de sacarose (4 g/l) aos 0, 10 e 20 dias de incubação. Os tubos foram novamente incubados até completar 30 dias, nas mesmas condições do ensaio anterior. Cada tratamento foi constituído por 20 tubos contendo um único esporo, sendo a parcela experimental constituída por cinco tubos.

Ao final dos períodos de incubação, os tubos foram levados ao microscópio estereoscópico para contagem do número de células auxiliares produzidas pelo micélio, e o sobrenadante foi utilizado para determinação do pH final do meio. O crescimento micelial foi avaliado por um método de interseções de hifas modificado de Hepper & Jakobsen (1983). O micélio proveniente de cada parcela experimental foi colocado em tubo de ensaio contendo 0,5 ml de H₂O e 50 contas de vidro (1 mm Ø), fragmentado por agitação em vórtex a 1/3 da velocidade máxima por 30 segundos, e transferido para membrana Millipore Quadriculada (HAGB-047, 9 mm² por quadrícula) por filtração a vácuo. Após secagem da membrana de filtro ao ar, procedeu-se à contagem, sob microscópio estereoscópico, do número de fragmentos de hifas que interceptavam as linhas horizontais do filtro.

Todos os ensaios foram delineados inteiramente ao acaso e repetidos pelo menos uma vez. Os dados de contagem de interseções de hifas foram transformados por $Y = \sqrt{x + 0,5}$ e submetidos à análise de variância e regressão polinomial, conforme programas de centro de processamento de dados da ESAL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos carboidratos estudados, apenas pectina e trealose influenciaram significativamente o crescimento micelial de *G. gigantea*. Pectina, quando adicionada em baixas concentrações, aumentou o crescimento micelial, enquanto que trealose exerceu efeitos inibitórios em todas as concentrações estudadas (Fig. 1). A capacidade de utilização de pectina por fungos MVA é também sugerida por estudos citológicos que demonstram certo grau de degradação

da lamela média pelas hifas do fungo durante a penetração intercelular do córtex da raiz hospedeira (Gianinazzi-Pearson et al. 1981) e pelo estudo de Siqueira & Hubbell (1986), no qual o crescimento micelial de *G. margarita in vitro* foi estimulado pelo ácido poligacturônico. Além disso, foi recentemente demonstrada a ocorrência de pectinases, celulases e hemicelulases em extratos de esporos de *Glomus mosseae* (Garcia-Romera et al. 1990). Portanto, é provável que *G. gigantea* apresente enzimas hidrolíticas capazes de degradar pec-

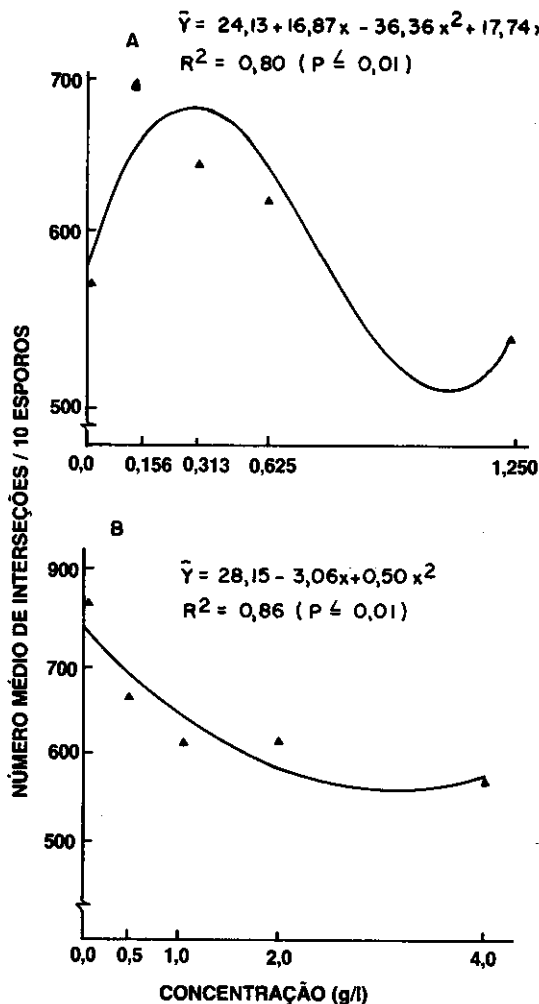


FIG. 1. Crescimento micelial de *G. gigantea* em resposta à adição de pectina (A) e trealose (B) ao meio nutritivo. Equação de dados transformados por $y = \sqrt{x + 0,5}$.

tina, permitindo assim a absorção de monômeros e sua utilização como fonte de carbono e energia para a elongação de hifas. O efeito inibitório obtido para a trealose neste estudo discorda dos resultados de Hepper (1979), que não verificou efeito deste carboidrato sobre o crescimento micelial de *Glomus caledonium*.

Não foram detectados efeitos significativos da ação de frutose, arabinose, manitol, sacarose e amido sobre o crescimento micelial de *G. gigantea*. A ausência de efeitos destes carboidratos sobre o crescimento micelial de outros fungos MVA foi também relatada por Hepper (1979, 1983) e por Mosse (1959). Esta aparente inabilidade de *G. gigantea* em responder à adição destes carboidratos sugere que: a) este fungo não apresenta as vias de absorção ou metabolização destes compostos; b) o fungo é capaz de absorvê-los, mas os mesmos estão sendo utilizados para armazenamento ou outras funções celulares não relacionadas com a elongação, e c) o fungo necessita de um período de incubação mais prolongado para indução e síntese dos sistemas enzimáticos envolvidos na absorção ou metabolização destes carboidratos, como relatado para outros fungos filamentosos por Pons et al. (1986) e por Sistrom & Machlis (1955), citados por Griffin (1981).

O crescimento micelial de *G. gigantea* foi estimulado quando sacarose foi adicionada ao meio nutritivo após 10 ou 20 dias de incubação dos esporos pré-germinados (Fig. 2). Para produção de micélio durante este período, o fungo provavelmente utilizou suas reservas endógenas de carbono, principalmente lipídios, e é possível que isto tenha resultado não apenas na degradação de grande parte dessas reservas, mas também na desrepressão ou indução de sistemas enzimáticos envolvidos na absorção e metabolização de fontes de carbono exógenas, como ocorre em outros fungos filamentosos (Garraway & Evans 1984). A ocorrência de modificações fisiológicas no micélio de *G. gigantea* após períodos de crescimento às expensas das reservas endógenas pode ser também inferida de dados apresentados por Koske (1982), que mostram que, *in vitro*,

as hifas deste fungo são atraídas intensamente por raízes hospedeiras apenas após um período de 12 a 14 dias de incubação.

Estudos adicionais se fazem necessários para estabelecer se este é um mecanismo operante nas respostas deste fungo a outros carboidratos e a outros compostos.

Todos os ácidos orgânicos estudados influenciaram significativamente o crescimento micelial de *G. gigantea* (Fig. 3). O crescimento micelial foi estimulado pela adição dos ácidos tartárico e cítrico. Efeitos estimulatórios destes ácidos orgânicos sobre o crescimento micelial de fungos MVA foram também relatados por Mosse (1959). Segundo Griffin (1981), os efeitos estimulatórios de ácidos orgânicos sobre o crescimento de fungos podem ser geralmente atribuídos ao seu poder tam-

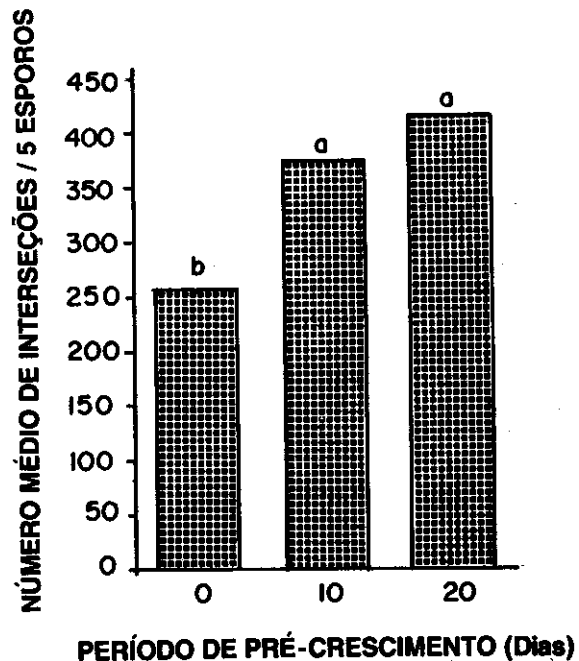


FIG. 2. Efeitos de períodos de pré-crescimento na ausência de fontes de carbono sobre a utilização subsequente de sacarose por *G. gigantea*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 5\%$).

pão. Entretanto, não se pode descartar a possibilidade de que estes compostos tenham exercido efeitos diretos sobre o fungo, sendo utilizados como fontes de carbono e energia para a elongação de hifas. Já os ácidos pirúvico e oxálico mostraram-se inibitórios ao crescimento. Entretanto, Hepper (1983) e Siqueira et al. (1982) não verificaram efeitos significativos do ácido pirúvico sobre o crescimento de outros fungos MVA.

O fornecimento deste ácido na forma do sal piruvato de sódio, neste estudo, pode ser responsável, em parte, pelos efeitos inibitórios observados, visto que o sódio, quando fon

acompanhante, parece exercer efeitos inibitórios sobre o crescimento de fungos MVA (Hepper 1984a e Hirrel 1981). Porém, a espécie de fungo utilizada no presente estudo é predominante em ecossistemas de dunas (Koske 1981), onde provavelmente prevalecem altos níveis de sódio em solução, e seria esperado que este fungo apresentasse uma menor sensibilidade ao fon que outras espécies de fungos MVA. A forte inibição do crescimento na presença do ácido oxálico pode ter sido resultante tanto de efeito direto quanto indireto deste ácido sobre o fungo, pois nestes ensaios foi observada a formação de um precipitado branco, provavelmente constituído de oxalato de cálcio resultante da reação do ácido com o cálcio presente no meio. Tal reação química resultaria em uma baixa disponibilidade de cálcio no meio que poderia ter prejudicado a elongação das hifas do fungo, uma vez que este fon é de extrema importância na manutenção da integridade de membranas celulares e pode ser essencial para o crescimento micelial.

A produção de células auxiliares nos diversos tratamentos é apresentada na Tabela 1. A maioria dos compostos estudados não influenciou o valor da mediana. Entretanto, compostos como frutose e amido tenderam a aumentar enquanto que trealose e ácido pirúvico tenderam a diminuir o número dessas estruturas por esporo. A grande variabilidade encontrada na produção de células auxiliares por *G. gigantea* parece indicar uma variação na capacidade intrínseca dos esporos em formar essas estruturas.

A determinação do pH do meio nutritivo ao final dos períodos de incubação mostrou que não ocorreram modificações acentuadas de pH em nenhum dos tratamentos, refletindo provavelmente a baixa taxa metabólica do fungo *in vitro*.

CONCLUSÕES

1. Efeitos estimulatórios de carboidratos sobre o crescimento micelial de *G. gigantea* foram obtidos apenas com baixas concentrações de pectina.

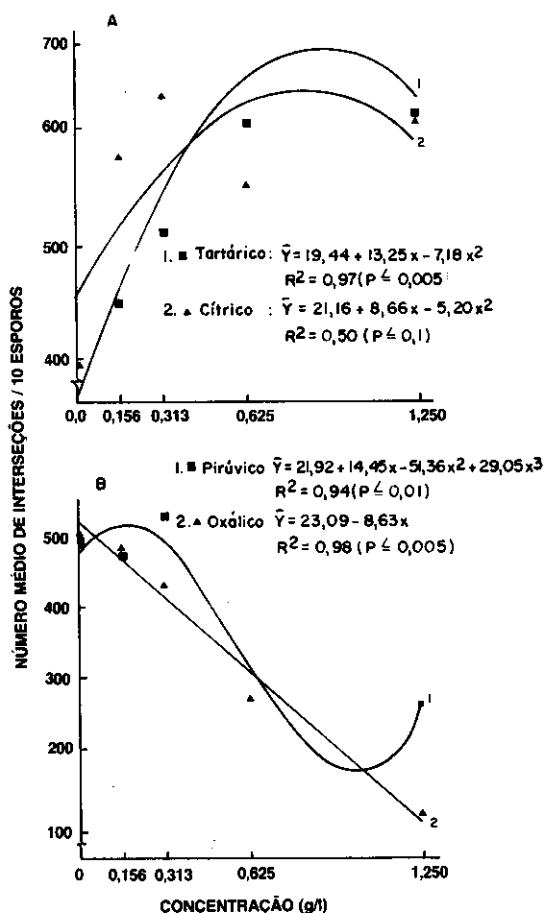


FIG. 3. Crescimento micelial de *G. gigantea* em meio nutritivo suplementado com os ácidos tartárico, cítrico, pirúvico e oxálico. Equação de dados transformados por $y = \sqrt{x + 0,5}$.

TABELA 1. Amplitude de variação da produção de células auxiliares pelo micélio de *G. gigantea* em meio nutritivo suplementado com carboidratos e ácidos orgânicos. Mediana entre parênteses. Dados de 60 esporos/tratamento.

Compostos orgânicos	Concentrações* g/l				
	0	1	2	3	4
Glicose	0-4 (0)	0-5 (0)	0-6 (0)	0-5 (0)	0-8 (0)
Pectina	0-18(0)	0-22(4)	0-16(4)	0-12(2)	0-15(3)
Trealose	0-8 (2)	0-7 (0)	0-4 (0)	0-3 (0)	0-4 (0)
Frutose	0-9 (1)	0-16(1)	0-18(2)	0-12(1)	0-11(0)
Arabinose	0-8 (0)	0-5 (0)	0-6 (0)	0-10(0)	0-3 (0)
Manitol	0-3 (0)	0-7 (0)	0-0 (0)	0-4 (0)	0-12(0)
Sacarose	0-7 (0)	0-8 (0)	0-7 (0)	0-4 (0)	0-3 (0)
Amido	0-12(1)	0-13(4)	0-13(0)	0-12(3)	0-9 (0)
Ácido tartárico	0-12(0)	0-7 (0)	0-3 (0)	0-13(0)	0-6 (0)
Ácido cítrico	0-6 (0)	0-3 (0)	0-9 (0)	0-3 (0)	0-5 (0)
Ácido pirúvico	0-10(1)	0-7 (0)	0-7 (0)	0-8 (0)	0-6 (0)
Ácido oxálico	0-8 (0)	0-6 (0)	0-5 (0)	0-5 (0)	0-2 (0)

* As concentrações 0, 1, 2, 3 e 4 correspondem a 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 g/l para carboidratos, e a 0,0; 0,156; 0,313; 0,625 e 1,250 g/l para ácidos orgânicos e pectina.

2. Trealose mostrou-se inibitória em todas as concentrações estudadas.

3. Frutose, arabinose, sacarose, manitol e amido não influenciaram significativamente o crescimento do fungo.

4. A sacarose estimulou o crescimento micelial quando adicionada após 10 ou 20 dias de incubação dos esporos pré-germinados em meio nutritivo.

5. Todos os ácidos orgânicos influenciaram significativamente o crescimento, sendo efeitos estimulatórios obtidos com os ácidos tartárico e cítrico e inibitórios com os ácidos pirúvico e oxálico.

6. Nenhum dos compostos orgânicos estudados sustentou a produção em massa de micélio de *G. gigantea in vitro*, na ausência de raízes vivas.

AGRADECIMENTOS

À pesquisadora Elizabeth de Oliveira, pela revisão do manuscrito; ao professor Ruben

Delly Veiga, pela orientação nas análises estatísticas; ao laboratorista Manoel Aparecido da Silva e às estagiárias Joelma, Islaine e Maria Geralda, pela assistência.

REFERÊNCIAS

- BEVEGE, D.I.; BOWEN, G.D.; SKINNER, M.F. Comparative carbohydrate physiology of ecto and endomycorrhizas. In: SANDERS, F.E.; MOSSE, B.; TINKER, P.B. (Eds.). **Endomycorrhizas**. London: Academic Press, 1975. p.149-174.
- 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 Phytologist**, Cambridge, v.101, p.417-426, 1985.
- COLOZZI-FILHO, A. **Desinfestação superficial de esporos de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares**. Lavras: ESAL, 1988. 80p. Tese de Mestrado.

- COX, G.; SANDERS, F.E.; TINKER, P.B.; WILD, J.A. Ultrastructural evidence relating to host-endophyte transfer in a vesicular-arbuscular mycorrhiza. In: SANDERS, F.E.; MOSSE, B.; TINKER, P.B. (Eds.). **Endomycorrhizas**. London: Academic Press, 1975. p.297-312.
- ELIAS, K.S.; SAFIR, G.R. Hyphal elongation of *Glomus fasciculatus* in response to root exsudates. **Applied Environmental Microbiology**, New York, v.53, n.8, p.1928-1933, ago. 1987.
- GARCIA-ROMERA, I.; GARCIA-GARRIDO, J.M.; MARTINEZ-MOLINA, E.; OCAMPO, J.A. Possible influence of hydrolytic enzymes on vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of alfafa. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.22, n.2, p.149-152, 1990.
- GARRAWAY, M.O.; EVANS, R. **Fungal nutrition and physiology**. New York: John Wiley & Sons, 1984. 401p.
- 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, v.46, n.2, p.235-244, 1963.
- GIANINAZZI-PEARSON, V.; MORANDI, D.; DEXHEIMER, J.; GIANINAZZI, S. Ultrastructural and ultracytochemical features of a *Glomus tenuis* mycorrhiza. **New Phytologist**, Cambridge, v.88, p.633-639, 1981.
- GRAHAM, J.H. Effect of citrus roots exudates on germination of chlamydospores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *Glomus epigaeum*. **Mycologia**, New York, v.74, n.5, p.831-835, Sept./Oct. 1982.
- GRIFFIN, D.H. **Fungal Physiology**. New York: John Wiley & Sons, 1981. 383p.
- HEPPER, C.M. Germination and growth of *Glomus caledonium* spores: the effects of inhibitors and nutrients. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.11, p.269-277, 1979.
- HEPPER, C.M. Inorganic sulphur nutrition of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus caledonium*. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.16, n.6, p.669-671, 1984a.
- HEPPER, C.M. Isolation and culture of VA mycorrhizal (VAM) fungi. In: POWELL, C.L.; BAGYARAJ, D.J. (Eds.). **VA mycorrhiza**, Boca Raton: CRB Press, 1984b. p.95-111.
- HEPPER, C.M. Limited independent growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *in vitro*. **New Phytologist**, Cambridge, v.93, n.4, p.537-542, Apr. 1983.
- HEPPER, C.M.; JAKOBSEN, I. Hyphal growth from spores of the mycorrhizal fungus *Glomus caledonium*: effect of amino acids. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.15, n.1, p.55-58, 1983.
- HIRREL, M.C. The effect of sodium and chloride salts on the germination of *Gigaspora margarita*. **Mycologia**, New York, v.73, n.4, p.610-617, jul./ago. 1981.
- KOSKE, R.E. Evidence for a volatile attractant from plant roots affecting germ tubes of a VA mycorrhizal fungus. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v.79, n.2, p.305-310, Oct. 1982.
- KOSKE, R.E. *Gigaspora gigantea*: observations on spore germination of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. **Mycologia**, New York, v.73, n.2, p.288-300, Mar./Apr. 1981.
- MASKALL, C.S. Biochemical studies of the VA endophyte. **Reports of the Rothamsted Experimental Station**, Harpenden, pt. 1, p.204-205, 1980.
- MOSSE, B. The regular germination of resting spores and some observations on the growth requirements of an *Endogone* sp. causing vesicular-arbuscular mycorrhiza. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v.42, p.275-286, 1959.
- PAULA, M.A. **Germinação e crescimento micelial de esporos de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares na presença de calos e suspensão de células**. Lavras: ESAL, 1988. 128p. Tese de Mestrado.
- PONS, S.; MUDGE, K.W.; NEGM, F.B. Effect of mannitol on the *in vitro* growth, temperature optimum, and subsequent ectomycorrhizal infectivity of *Pisolithus tinctorius*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.64, n.9, p.1812-1816, Sept. 1986.
- SIQUEIRA, J.O.; HUBBELL, D.H. Effect of organic substrates on germination and germ tube

growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus spores *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.21, n.5, p.523-527, 1986.

SIQUEIRA, J.O.; HUBBELL, D.H.; SCHENCK, N.C. Germination and germ tube growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *in vitro*. **Mycologia**, New York, v.74, n.60, p.952-959, Nov./Dec. 1982.