

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA - DEPTO. DE SOLOS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO

EFEITO DOS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA SOBRE O METABOLISMO
DE RAÍZES TRANSGÊNICAS (RI T-DNA) DE
CENOURA (*Daucus carota* L.) E DE TREVO (*Trifolium repens* L.)
COM OU SEM MICORRIZA

Eidy Simões de Souza

SEROPÉDICA / RJ
Dezembro/1998

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA - DEPTO. DE SOLOS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - CIÊNCIA DO SOLO

EFEITO DOS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA SOBRE O METABOLISMO
DE RAÍZES TRANSGÊNICAS (RI T-DNA) DE
CENOURA (*Daucus carota* L.) E DE TREVO (*Trifolium repens* L.)
COM OU SEM MICORRIZA

Eidy Simões de Souza

Orientação:

Ricardo Luis Louro Berbara
Sonia Regina de Souza

*Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de
Phylosophiae Doctor em Agronomia,
Área de Concentração em Ciência do
Solo.*

Seropédica / RJ

S729e

Souza, Eidy Simões de

Efeito dos diferentes meios de cultura sobre o metabolismo de raízes transgênicas (*Ri T-DNA*) de cenoura (*Daucus carota* L.) e de trevo (*trifolium repens* L.) com ou sem micorriza. Seropédica, UFRRJ/IA 1998.

155p

1. Raiz transgênica-Protease. 2. Raiz transgênica-Micorriza. 3. Raiz transgênica-Metabolismo-Nitrogênio. 4. Raiz transgênica-Meio de cultura. 5. Raiz transgênica-Produção. 6. Raiz transgênica-Biomassa-Produção. 7. Raiz transgênica-Propagação. 8. Raiz transgênica. 9. Cenoura-Cultivo *in vitro*. 10. Cenoura-Raiz transgênica-Metabolismo. 11. Cenoura-Micorriza. 12. Trevo-Transgênica-Metabolismo . 13. Trevo-Micorriza. 14. Cultivo *in vitro*. 15. *Daucus carota* L. 16. *Trifolium repens* L. 16 Micorriza. 17. Biotecnologia. I Título.

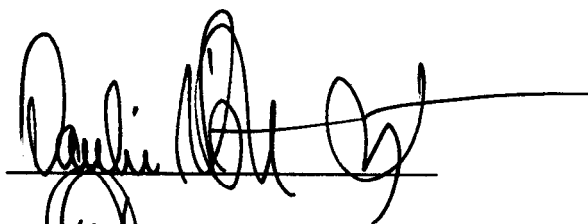
CDD-620.8

**EFEITO DOS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA SOBRE O METABOLISMO
DE RAÍZES TRANSGÊNICAS (RI T-DNA) DE
CENOURA (*Daucus carota* L.) E DE TREVO (*Trifolium repens* L.)
COM OU SEM MICORRIZA**

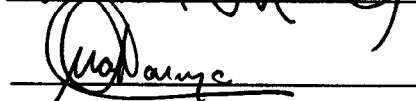
Eidy Simões de Souza

Aprovada em: 22 / 12 / 1998

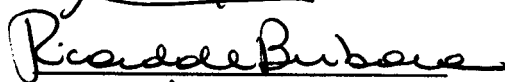
Prof. Dr. Manlio Silvestre Fenandes



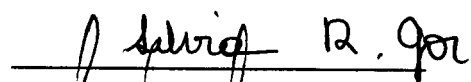
Prof^a. Dr^a. Margarida Gorete Ferreira do Carmo



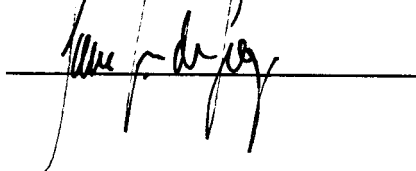
Prof. Dr. Ricardo Luis Louro Berbara



Prof^a. Dr^a. Silvia Regina Goi



Prof^a. Dr^a. Sonia Regina de Souza



**À Minha mãe,
com muita saudade.**

Agradecimentos

À FAPERJ pela bolsa de estudo, que possibilitou a realização deste trabalho.

À EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia, FAPERJ - Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro e IPA - Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, pelo financiamento do projeto.

À professora Sonia Regina de Souza, pela orientação, apoio, confiança e amizade.

Ao professor Ricardo Luis Louro Berbara, pela orientação e oportunidade de estudo com as raízes transgênicas.

Ao pesquisador Hélio Almeida Burity, da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária - IPA, meu Conselheiro Acadêmico na realização do Doutorado, pela confiança e incentivo.

Ao professor Manlio Silvestre Femandes, pela atenção e sugestões valiosas.

Ao professor Roberto Rossiello, Nilson Brito, Vauvenagues e Daniele Borges, da secretaria de Pós-Graduação em Ciência do Solo, por todo apoio recebido durante estes anos.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Solos da UFRRJ, pela orientação, carinho e amizade.

As colegas e amigas, Sandra Sanchez, Christine Sanchez, Elvia Mariam Stark, Eliane Borges e Jane Baptista, pela amizade, companheirismo e ajuda imprescindível na execução de etapas importantes deste trabalho.

Aos colegas e amigos da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária - IPA, em especial ao Laboratório de Biologia do Solo e Biblioteca, pelo incentivo, carinho e amizade.

As Pesquisadoras Norma Gouveia Rumjanek e Eliane Ribeiro, do Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia, pelo apoio e incentivo.

À Supervisora de Laboratórios, Rojane Chapeta Peixoto da EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia, pela atenção e amizade.

Ao Departamento de Fitopatologia, em especial ao professor Funjiu, pelo auxílio nas fotografias.

Ao laboratorista Itamar Garcia, EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia, pela multiplicação dos FMA utilizados.

Ao meu Pai, irmãos, sobrinhos e primos pelo carinho e incentivo.

À Gilberto Yokomizo, pela amizade tranqüila, grande amor, carinho e apoio em todos os momentos do nosso convívio.

À Maria do Carmo Santana dos Santos, colega e grande amiga de todos os momentos.

As amigas Lindete Martins, Valéria Zago, Márcia Fernandes e Marta Bruno, pela união e apenas início de uma grande amizade.

Às colegas e amigas, Aurilúcia, Raquel, Márcia e Bianca, pelo convívio de paz, alegria e momentos de orações que nos fortalecia nas horas difíceis.

À minha madrinha Amanzil, pelo carinho e incentivo.

À Deus que me deu o privilégio de poder fazer e concluir este curso e além disso, fazer novas amizades.

À todos com muita saudade.

ÍNDICE GERAL

RESUMO GERAL	xv
CAPÍTULO I	
AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO E ATIVIDADE DAS PROTEASES EM RAÍZES TRANSGÊNICAS (<i>Ri T-DNA</i>) DE CENOURA (<i>Daucus carota</i> L.) E DE TREVO (<i>Trifolium repens</i> L.) EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA	1
RESUMO	2
ABSTRACT	4
I - INTRODUÇÃO	7
II - REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 - Produção de raízes transgênicas	10
2.1.1 - Transformação de plantas utilizando <i>Agrobacterium</i> como vetor	10
2.1.2 - Processo de infecção	11
2.2 - Meio de cultura para manutenção das raízes transgênicas	13
2.3 - Comportamento do tecido vegetal em sistema <i>in vitro</i> em diferentes meios de cultura	14
3- MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1- Desenvolvimento do trabalho	17
3.1.1- Obtenção de raízes	17

3.1.2- Escolha dos meios	18
3.2- Determinação de biomassa radicular	22
3.2.1- Crescimento das raízes	22
3.2.2- Peso fresco total das raízes	22
3.3- Extração alcoólica no material fresco	22
3.3.1- Determinação do teor de N-amino	23
3.3.2- Determinação do teor de açúcares solúveis	23
3.3.3- Determinação do teor de N-nitrato	24
3.3.4- Determinação do teor de N-amônio	24
3.4- Atividade das Proteases	25
3.4.1- Proteína do extrato enzimático	26
 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	 27
4.1- Desenvolvimento das raízes	27
4.1.1- Crescimento das raízes	27
4.1.2- Peso fresco total de raízes	31
4.2.1- Teor de N-amino livre	33
4.2.2- Teor de açúcares solúveis	35
4.2.3- Teor de N-nitrato	37
4.2.4- Teor de N-amônio	39
4.4- Atividade das proteases e teor de proteína do extrato enzimático	41
 V- CONCLUSÕES	 45
 VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 46

CAPÍTULO II
 ESTUDO METABÓLICO DE RAÍZES TRANSGÊNICAS (*Ri T-DNA*)
 DE CENOURA (*Daucus carota* L.) E DE TREVO (*Trifolium repens*
 L.) EM SIMBIOSE COM MICORRIZA ARBUSCULAR (*Glomus*
clarum) EM DOIS MEIOS DE CULTURA

RESUMO	56
ABSTRACT	58
I - INTRODUÇÃO	60
II - REVISÃO DE LITERATURA	62
2.1- Associações micorrízicas e seu papel na nutrição mineral de plantas	62
2.1.1- Associações com fungos micorrízicos arbusculares (FMA)	62
2.1.2- Absorção de N em associações micorrízicas	64
2.1.3- Desempenho das associações micorrízicas na utilização de NO_3	65
2.1.4- Desempenho das associações micorrízicas na utilização de NH_4	66
2.1.5- Associação de leguminosas com fungos micorrízicos	68
2.1.6- Associações com ectomicorizas	68
2.2- Uso de micorizas e dificuldades para a produção de inóculo de FMA	67
2.2.1- Uso de micorrizas	70
2.2.2- Dificuldades para a produção de inóculo de FMA	71
2.3- Uso de raízes transgênicas	72
2.3.1- Raízes transgênicas e sua associação com os FMA	72
2.4- Metabolismo de N em raízes micorizadas	74
2.5- Metabolismo de N em associações de raízes transgênicas (<i>Ri T-DNA</i>)	75
2.6- Comparação do metabolismo de N em raízes micorizadas e não micorizadas	76

III- MATERIAL E MÉTODOS	78
3.1- Meios para desenvolvimento das raízes transgênicas	78
3.2- Preparo dos esporos do <i>Glomus clarum</i>	80
3.3- Monitoramento microscópico da simbiose raízes transgênicas de cenoura e de trevo e <i>Glomus clarum</i> , em meio mínimo ou MS	81
3.4- Análise das Enzimas	82
3.4.1- Extração das enzimas	82
3.4.2- Atividade da Nitrato Redutase - NR	82
3.4.3- Atividade da Glutamina Sintetase - GS	82
3.4.4- Atividade da Glutamato Sintase - GOGAT	82
3.4.5- Atividade da Glutamato Desidrogenase - GDH	82
IV- RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
4.1- Monitoramento microscópico da simbiose raízes transgênicas de cenoura e de trevo e <i>Glomus clarum</i> , em meio mínimo ou MS	86
4.1.1- Características das raízes	86
4.1.2- Características da simbiose entre raízes transgênicas e o FMA <i>Glomus clarum</i>	87
4.2- Peso fresco das raízes	92
4.3- Determinação do teor de N-amino	95
4.4- Determinação do teor de açúcares solúveis	98
4.5- Determinação do teor de N-nitrato	101
4.6- Determinação do teor de N-amônio	103
4.7- Enzimas	106
4.7.1- Atividade da Nitrato Redutase - NR	106

4.7.2- Atividade da Glutamina Sintetase - GS	107
4.7.3- Atividade da Glutamato Sintase - GOGAT	110
4.7.4- Atividade da Glutamato Desidrogenase - GDH	111
4.7.5- Atividade das Proteases	118
4.8- Proteína nos extratos enzimáticos	121
4.9- Discussão Geral	125
 V- CONCLUSÕES	 128
 VI- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 129
ANEXO	142

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1: Crescimento das raízes transgênicas de cenoura e trevo (interseções/0,25 cm²) nos primeiros 28 dias de cultivo em diferentes meios de cultura.	28
Figura 2: Peso fresco das raízes transgênicas de cenoura e trevo (g/placa) aos 81 dias de cultivo em diferentes meios de cultura.	32
Figura 3: Teor de N-amino livre em raízes transgênicas de cenoura e trevo (umol/g P.F.) aos 81 dias de cultivo em diferentes meios de cultura.	34
Figura 4: Teor de açúcares solúveis em raízes transgênicas de cenoura e trevo (mg/g P.F.) aos 81 dias de cultivo em diferentes meios de cultura.	36
Figura 5: Teor de N-nitrato em raízes transgênicas de cenoura e trevo (μmol/g P.F.) aos 81 dias de cultivo em diferentes meios de cultura.	38
Figura 6: Teor de N-amônio em raízes transgênicas de cenoura e trevo (μmol/g P.F.) aos 81 dias de cultivo em diferentes meios de cultura.	40
Figura 7: Atividade das proteases aos 60 e 120 em raízes transgênicas de cenoura e trevo minutos (μmol/g P.F.) aos 81 dias de cultivo em diferentes meios de cultura.	42
Figura 8: Quantidade de proteína do extrato de proteases (μg/g P.F.) em RT de cenoura e trevo aos 81 dias de cultivo em diferentes meios de cultura.	43

CAPÍTULO II

- Figura 1: Peso fresco de RT de cenoura e trevo (g/placa) desenvolvidas em meio mínimo ou MS, com ou sem fungo micorrízico. Coletas 1, 2 e 3 aos 49/21; 84/56 e 132/111 dias de repicagem de raiz/inoculação de fungo. 93
- Figura 2: Teor de N-amino livre de raízes transgênicas de cenoura e trevo ($\mu\text{mol/g}$ P.F.) desenvolvidas em meio mínimo ou MS, com ou sem fungo micorrízico. Coletas 1, 2 e 3 aos 49/21; 84/56 e 132/111 dias de repicagem de raiz/inoculação de fungo. 96
- Figura 3: Teor de açúcares solúveis de raízes transgênicas de cenoura e trevo (m/g P.F.) desenvolvidas em meio mínimo ou MS, com ou sem fungo micorrízico. Coletas 1, 2 e 3 aos 49/21; 84/56 e 132/111 dias de repicagem de raiz/inoculação de fungo. 99
- Figura 4: Teor de N-nitrato de raízes transgênicas de cenoura e trevo ($\mu\text{mol/g}$ P.F.) desenvolvidas em meio mínimo ou MS, com ou sem fungo micorrízico. Coletas 1, 2 e 3 aos 49/21; 84/56 e 132/111 dias de repicagem de raiz/inoculação de fungo. 102
- Figura 5: Teor de N-amônio de raízes transgênicas de cenoura e trevo ($\mu\text{mol/g}$ P.F.) desenvolvidas em meio mínimo ou MS, com ou sem fungo micorrízico. Coletas 1, 2 e 3 aos 49/21; 84/56 e 132/111 dias de repicagem de raiz/inoculação de fungo. 104
- Figura 6: Atividade da Glutamina Sintetase de raízes transgênicas de cenoura e trevo (nmol/g pf/min) desenvolvidas em meio mínimo ou MS, com ou sem fungo micorrízico. Coletas 1, 2 e 3 aos 49/21; 84/56 e 132/111 dias de repicagem de raiz/inoculação de fungo. 108
- Figura 7: Atividade da Glutamato Sintase de raízes transgênicas de cenoura e trevo ($\mu\text{mol/g}$ pf/min) desenvolvidas em meio mínimo ou MS, com ou sem fungo micorrízico. Coletas 1, 2 e 3 aos 49/21; 84/56 e 132/111 dias de repicagem de raiz/inoculação de fungo. 110
- Figura 8: Atividade da Glutamato Desidrogenase aminação de raízes transgênicas de cenoura e trevo ($\mu\text{mol/g}$ pf/min) desenvolvidas em meio mínimo ou MS, com ou sem fungo micorrízico. Coletas 1, 2 e 3 aos 49/21; 84/56 e 132/111 dias de repicagem de raiz/inoculação de fungo. 112

- Figura 9: Atividade da Glutamato Desidrogenase desaminação de raízes transgênicas de cenoura e trevo (**$\mu\text{mol/g}$ pf/min**) desenvolvidas em meio mínimo ou MS, com ou sem fungo micorrízico. Coletas 1, 2 e 3 aos 49/21; 84/56 e 132/111 dias de repicagem de raiz/inoculação de fungo. 116
- Figura 10: Atividade da Proteases de raízes transgênicas de cenoura e trevo (**$\mu\text{mol/g}$ pf/h**) desenvolvidas em meio mínimo ou MS, com ou sem RT. Coletas 2 e 3 aos 84/56 e 132/1 11 dias de repicagem de raiz/inoculação de fungo. 119
- Figura 11: Quantidade de proteína do extrato das enzimas GS, GOGAT e GDH (**$\mu\text{g/g}$ P.F.**) em raízes transgênicas de cenoura e trevo aos 81 dias de cultivo em meio mínimo ou MS. 122
- Figura 12: Quantidade de proteína do extrato de proteases (**$\mu\text{g/g}$ P.F.**) e raízes transgênicas de cenoura e trevo aos 81 dias de cultivo em meio mínimo ou MS. 123

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1: Composição dos diferentes meios de cultivos de raízes transgênicas de cenoura e trevo.	19
Tabela 2: Concentração dos nutrientes utilizados na formulação dos meios de raízes transgênicas de cenoura e trevo.	20
Tabela 3: Concentrações e proporções de cada fonte de N nos meios utilizados na formulação dos meios de cultivo de raízes transgênicas de cenoura e trevo.	21

CAPÍTULO II

Tabela 1: Concentrações e proporções de cada fonte de N nos meios	79
---	----

ÍNDICE DE FOTOS

CAPÍTULO I

Foto 1:	Crescimento das raízes transgênicas de cenoura e de trevo em meio mínimo	29
Foto 2:	Crescimento das raízes transgênicas de cenoura e de trevo em meio MS	29
Foto 3:	Crescimento das raízes transgênicas de cenoura e de trevo em meio mínimo com citrato de NH_4^+	30
Foto 4:	Crescimento das raízes transgênicas de cenoura e de trevo em meio mínimo com uréia	30

CAPÍTULO II

Foto 1:	Esporo do FMA <i>Glomus clarum</i> .	88
Foto 2:	Esporo germinado do FMA <i>Glomus clarum</i>	88
Foto 3:	Aparecimento de vesículas nas hifas do FMA <i>Glomus clarum</i> em raízes transgênicas cultivadas em meio mínimo ou MS	89
Foto 4:	Detalhe ampliado da foto 3 (em A) de uma vesícula do FMA <i>Glomus clarum</i> em raízes transgênicas cultivadas em meio mínimo ou MS	89
Foto 5:	Células auxiliares do FMA <i>G. margarita</i> desenvolvidas em associação com raízes transgênicas em meio mínimo	90

ABREVIATURAS

- * FM - fungo micorrízico
- * FMA - fungo micorrízico arbuscular
- * F - tratamentos com FMA
- * *G. clarum* - *Glomus clarum*
- * GDH - Glutamato Desidrogenase
- * GDHa - Glutamato Desidrogenase aminação
- * GDHd - Glutamato Desidrogenase desaminação
- * GOGAT - Glutamina Sintase
- * GS - Glutamina Sintetase
- * K_M - constante de Michaelis-Menten
- * MM - meio mínimo
- * MS - meio Murashige & Skoog
- * N - nitrogênio
- * NR - Nitrato Redutase
- * RT - raízes transgênicas
- * PF - Peso Fresco
- * DO - Densidade Ótica

Resumo Geral

Apesar dos benefícios dos fungos micorrízicos arbusculares (FMA) para as plantas, a impossibilidade do cultivo desses fungos *in vitro*, limitou os estudos metabólicos e a produção de inóculos, pois o FMA só se propaga na presença de tecido vegetal metabolicamente ativo. Entretanto, com a manipulação genética é possível modificar raízes, introduzindo DNA de plasmídeo bacteriano indutor de enraizamento (*Ri T-DNA*), de maneira que as raízes se propaguem em meio de cultura, e que podem ser usadas como substrato para a colonização por FMA. No entanto, pouco é conhecido sobre o metabolismo destas raízes e sua simbiose com o FMA. O objetivo deste trabalho foi avaliar o meio mais adequado para a propagação das raízes transgênicas (RT) de cenoura (*Daucus carota* L.) e trevo (*Trifolium repens* L.), e seu metabolismo em simbiose ou não com FMA (*Glomus clarum*). Para isto foram desenvolvidos três experimentos. No primeiro as raízes foram cultivadas em diferentes meios: mínimo, MS e mínimo modificado, com citrato de amônio ou uréia. Entre os quatro meios utilizados, os com nitrogênio na forma inorgânica, foram os que mais favoreceram o crescimento das duas espécies de RT. O meio MS foi o que apresentou maior acúmulo de N-amino livre, N-

nitrato e N-amônio, em ambas raízes. As proteases nas RT de cenoura e de trevo desenvolvidas nos diferentes meios de cultura, de um modo geral, apresentaram atividade aos 60 minutos de incubação, em solução de albumina, estabilizando a atividade neste tempo, com exceção do meio MS, que apresentou maior atividade proteolítica aos 120 minutos. De acordo com estes resultados os meios mais propícios à propagação de RT de cenoura e de trevo foram o mínimo e o MS, constituídos com N na forma inorgânica de NO_3^- ou associado ao NH_4^+ , respectivamente. Com estas informações foram desenvolvidos os outros dois experimentos, utilizando apenas o meio mínimo e o MS, com ou sem fungo micorrízicos. O delineamento estatístico utilizado foi em um fatorial inteiramente ao acaso, sendo os tratamentos arranjados em fatorial $2 \times 2 \times 3$ (dois meios, presença ou ausência de FMA e três coletas), tanto para as raízes de cenoura como de trevo. As RT de cenoura e de trevo, apresentaram maior teor de N-amino, e N- NH_4^+ , quando foram cultivadas em meio MS, com maior teor no início do crescimento vegetativo. Quanto aos teores de açúcares solúveis, também apresentaram maior acúmulo no estágio de máximo crescimento vegetal, porém, apresentaram comportamento diferenciado entre as espécies de RT. As raízes de cenoura apresentaram maior acúmulo no meio mínimo enquanto as raízes de trevo apresentaram maior acúmulo no meio MS. A atividade da GS foi detectada apenas na primeira coleta, tanto para as raízes de cenoura como para as de trevo, a maior atividade ocorreu em meio MS, que apresentava uma maior concentração de N. A atividade das enzimas GOGAT, GDHa e GDHd, aumentaram na coleta 2 (aos 84 dias de cultivo das RT), com o desenvolvimento do processo de senescência das raízes. O maior aumento da atividade das proteases foi observado quando

as RT foram cultivadas em meio MS, sendo mais acentuado na coleta 3 (132 dias de cultivo das RT), quando as raízes encontravam-se em senescência. O *G. clarum* favoreceu o aumento da atividade das proteases nas raízes de cenoura e reduziu nas de trevo. A proteína do extrato enzimático das enzimas de assimilação do N e extrato das proteases, foram maiores para as RT cultivadas em meio MS, devido a concentração de N neste meio. O *G. clarum* em associação com as raízes de cenoura influenciou no maior teor de proteína nos dois extratos. Os resultados demonstraram que quando as RT apresentaram a máxima produção de biomassa (aos 49 dias do cultivo das raízes), exauriram os nutrientes do meio de cultivo e principalmente o carbono, influenciando no desencadeamento do processo de senescência (84 dias). Com o aumento da senescência (132 dias) das raízes, ocorreu uma maior degradação dos tecidos radiculares, que foi caracterizado pelo aumento das enzimas catabólicas, proteases e GDHd, que atuaram na degradação das proteínas, liberando os aminoácidos, produzindo esqueletos de carbono e energia, que possivelmente foram utilizados para reincorporar o N- Reciclado, através da enzima GDHa e da GOGAT. Os resultados indicam que a via GS/GOGAT, característica dos tecidos vegetais deixa de atuar em sincronismo, sendo substituída por GDH/GOGAT em condições de estresse ou senescência, quando há excesso de amônio.

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO E ATIVIDADE DAS PROTEASES EM RAÍZES TRANSGÊNICAS (*Ri T-DNA*) DE CENOURA (*Daucus carota* L.) E DE TREVO (*Trifolium repens* L.) EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

RESUMO

Este experimento foi realizado com o objetivo de avaliar o comportamento de raízes transgênicas de cenoura (*Daucus carota* L.) e de trevo (*Trifolium repens* L.), quando cultivadas em diferentes meios de cultura, Mínimo ou MS, com nitrogênio fornecido na forma orgânica ou inorgânica. O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente ao acaso, sendo os tratamentos constituídos de um fatorial 4x2 (meios: mínimo, MS, mínimo modificado, com citrato de amônio e uréia; raízes: cenoura e trevo), com três repetições. Entre os quatro meios utilizados, os meios de cultura mínimo e MS, foram os que mais favoreceram o crescimento e peso fresco das duas espécies de RT. O meio MS constituído com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$, foi o que apresentou maior acúmulo de N-amino livre, N-nitrato e N-amônio, em ambas as raízes. Os meios com fontes de N orgânica (citrato de NH_4^+ ou uréia), foram os que induziram maior acúmulo de açúcares solúveis e de proteína (extrato das proteases) nas raízes. As proteases nas RT de cenoura e de trevo desenvolvidas nos meios com diferentes fontes de N, de um modo geral, apresentaram atividade aos 60 minutos de incubação, em solução de albumina, estabilizando a atividade neste tempo, com exceção do meio MS, que apresentou maior atividade proteolítica aos 120 minutos. Os meios mais propícios à propagação de RT de cenoura e de trevo seria os que tivessem N na forma inorgânica

mínimo ou MS. Entretanto a utilização e proporção de NH_4^+ no meio de cultura para o cultivo destas raízes, deve estar condicionado ao uso experimental das mesmas, pois ocorre aumento da atividade das proteases nessas condições.

ABSTRACT

This experiment was carried out aiming to evaluate the behavior of transgenic carrot roots (*Daucus carota* L.) and clover (*Trifolium repens* L.), when cultivated in different culture media, Minimum or MS, with nitrogen supplied in the organic or inorganic form. It was used a completely randomized statistical design, being the treatments constituted of a factorial 4x2 (Media: minimum, MS, modified minimum, with ammonium citrate and urea; Roots: carrot and clover), with three replicates. Among the treatments, the media of culture minimum and MS, favored more the growth and fresh weight of the two species of RT. The MS media constituted with $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$, presented the higher accumulation of free N-amino, N-nitrate and N-ammonium, in both roots. The media with sources of organic N (citrate of NH_4^+ or urea), induced larger accumulation of soluble sugars and protein (extract of the proteases) in the roots. In a general way, the proteases in carrot and clover RT developed in the media with different sources of N, presented activity after 60 minutes of incubation, in albumin solution, stabilizing the activity at this time, except for the MS media, that presented higher activity proteolytic after 120 minutes. The most favorable media for the propagation of carrot and clover RT, would be the media with N in the form inorganic minimum or MS. However, the use and

proportion of NH_4^+ in the culture media for the cultivation of these roots, should be conditioned to the experimental use of them, due to an increase of activity of the proteases in that conditions.

1 - INTRODUÇÃO

Os meios nutritivos que são utilizados para o cultivo de vegetais em sistemas *in vitro* fornecem as substâncias essenciais para o crescimento das plantas, sendo o nitrogênio é um dos elementos minerais exigido em maior quantidade. Cerca de 90% do N-total da planta encontra-se na forma orgânica e desempenha funções estruturais como de constituintes de macromoléculas e de enzimas.

As plantas superiores são capazes de absorver o N tanto na forma orgânica (aminoácidos, uréia, citrato) como inorgânica (amônio e principalmente o nitrato nas condições naturais) (Abreu & Monteiro, 1998; Souza Junior et al., 1998; Vale et al., 1998).

O suplemento de nitrogênio na forma de sais inorgânicos de amônia para o cultivo de células, geralmente apresenta sintomas de toxidez (Gamborg, 1970; Gamborg & Shyluk, 1970). Uma alternativa para o uso de amônia como única fonte de nitrogênio, é a utilização desse nutriente na forma de sal de um ácido orgânico, sendo indicado neste caso um ácido do Ciclo de Krebs, como o alfa-cetoglutarato ou o citrato (Yatazama & Furuhashi, 1968; Gamborg & Shyluk, 1970; Lindsey, 1993).

Os ácidos do Ciclo de Krebs apresentam um efeito diferencial sob o crescimento de células, dependendo da concentração usada, da fonte de

nitrogênio e do tipo de célula (Fukunaga, et al. 1980). Em um experimento com células de tabaco, alfafa e trigo, crescidos em meio com amônio na forma de alfa-cetoglutarato, apenas as células de tabaco apresentaram sintomas de toxidez quando o citrato foi usado como fonte de amônia nas concentrações de 5,10 e 15 mM (Fukunaga et al., 1978).

Outra fonte de N usada em meio de cultura é a uréia, que pode ser assimilada por duas vias metabólicas diferentes. Uma via envolve a hidrólise direta da uréia em NH_4^+ e CO_2 , catalisada pela urease. A outra, envolve a carboxilação da uréia em alofanato, seguida da hidrólise deste alofanato em NH_4^+ e CO_2 . Nas plantas superiores a uréia é hidrolisada apenas pela urease, tendo sido estudadas em várias espécies (Granick, 1937; Matsumoto et al. 1966; Polacco & Holland, 1993). O aumento da atividade da urease em resposta a uréia tem sido relatada em plantas de soja (Polacco, 1976), couve (Zago, 1997), e rabanete (Souza Junior, 1998). Segundo Skokut & Filner (1977), a atividade da urease aumenta poucas horas após a exposição das células da planta a uréia.

O nitrato, fornecido como única fonte de nitrogênio, apresenta uma excelente resposta de crescimento em várias culturas, podendo ser citado como forma recomendada para tabaco (Matusmoto et al., 1971), trevo branco (Schontz et al., 1989), brassica (Lainé et al., 1995) e forrageiras (Abreu & Monteiro, 1998).

Altas taxas de crescimento ocorrem em meio de cultura que fornece o suprimento de nitrogênio através de uma mistura de amônio e nitrato, quando consideradas concentrações adequadas na mistura. E em uma mistura onde a concentração de amônio é inibitória e a concentração de nitrato é baixa, o

crescimento vegetal pode ser favorecido quando a concentração de nitrato for aumentada (Caldas & Caldas, 1976; Ojima & Ohira, 1978; Vale et al., 1998). O meio MS de Murashige & Skoog (1962), que contém 66 mg de N-NO_3^- e 34 mg de N-NH_4^+ é um exemplo da mistura das duas fontes de N que é utilizada para o cultivo de células e tecidos vegetais em sistema *in vitro* (Zanette et al., 1995; Maciel et al., 1995; Kunz & Lovato, 1998).

Os estudos de assimilação do N em plantas superiores, vem sendo desenvolvidos em diferentes espécies vegetais com diversos objetivos, tais como: formas de N mais absorvidas; como diferentes fontes de N são assimiladas; quais as enzimas envolvidas na assimilação; a localização de cada uma dessas; os fatores que influenciam na atividade de cada enzima; os mecanismos que desencadeiam esses processos, entre outros. As plantas utilizadas nestes trabalhos, são em sua maioria cultivadas em sistema natural, ou seja, no solo e expostas à influências ambientais. Outras técnicas utilizam o cultivo *in vitro*, com planta inteira, ou com raízes destacadas transformadas geneticamente (*Ri T-DNA*) (Mugnier & Mosse, 1987; Becard & Fortin, 1988; Berbara, 1995).

O cultivo de RT de espécies vegetais com dependência micorrízica, possibilita a simbiose de FMA em sistema *in vitro*, e assim, o estudo das diferentes fases dessa associação em um sistema controlado.

Como não consta na literatura estudos referentes a características bioquímicas das RT, colonizadas com FMA ou não, decidiu-se avaliar o comportamento de raízes transformadas *Ri T-DNA* de cenoura (*Daucus carota* L.) e de trevo (*Trifolium repens* L.), em diferentes meios de cultura, quando o nitrogênio do meio de cultura é fornecido na forma de nitrato e/ou de amônio,

através de fontes orgânicas e inorgânicas, visando consolidar bases para novos estudos com associações micorrízicas.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - PRODUÇÃO DE RAÍZES TRANSGÊNICAS

2.1.1- Transformação de plantas utilizando *Agrobacterium* como vetor

A *Agrobacterium sp* é uma bactéria do solo representada por duas espécies, a *Agrobacterium tumefaciens* causadora de galha da coroa ("crown gall"), e a *Agrobacterium rhizogenes*, que provoca a síndrome das raízes em cabeleira ("hairy root") (Brasileiro, 1993).

A faixa de hospedeiros de *Agrobacterium* é ampla entre as dicotiledôneas e restrita entre as monocotiledôneas e gimnospermas. Mesmo entre as dicotiledôneas a susceptibilidade da planta à infecção por *Agrobacterium* difere muito entre e dentro das espécies, variando muito em função da interação com o hospedeiro. Uma etapa inicial importante para o desenvolvimento de metodologias que visem a obtenção de plantas transgênicas através da *Agrobacterium* é a determinação da melhor combinação patógeno-hospedeiro para uma determinada espécie (Lacorte & Mansur, 1993).

Enquanto a maioria das dicotiledôneas responde à infecção por

Agrobacterium com estímulos a divisão celular a partir do ponto de infecção, através de mecanismos de regeneração vegetal no ponto de explante, nas gramíneas, a *Agrobacterium* pode transferir o T-DNA mas as células transformadas não se dividem. Células vizinhas aos sítios de infecção produzem compostos fenólicos e as células transformadas não conseguem se multiplicar (Fisk & Dandekar, 1993; Vasil, 1994).

2.1.2 - Processo de Infecção

A capacidade de infecção se deve à presença do plasmídeo Ti (indutor de tumor) em cepas de *Agrobacterium tumefaciens* e Ri (“indutor de raiz”) em *Agrobacterium rhizogenes*. Plasmídeos são moléculas de DNA circular que podem ser transferidos para outros organismos, onde podem sofrer recombinação com outros plasmídeos ou serem integrados ao genoma nuclear. Essa porção transferida é denominada de T-DNA (“DNA transferido”) (Souza, 1987; Brasileiro, 1993; Vasil, 1994).

A infecção de uma planta por *Agrobacterium* é iniciada pela penetração desta no tecido vegetal através de ferimento na planta. As bactérias são atraídas e migram em direção à célula vegetal por compostos fenólicos, aminoácidos e açúcares (sinais moleculares) exsudadas do tecido lesado em consequência do ferimento. Além de atrair a bactéria, os sinais moleculares também ativam os genes de virulência localizados em plasmídeo denominado Ti ou Ri, que está presente em estirpes virulentas de *Agrobacterium*. Os genes de virulência, após ativados, induzem a transferência do plasmídeo Ti/Ri (região T), da bactéria

para o genoma da célula da planta (Jouanin et al., 1993; Tinland, 1996).

Os genes contidos no T-DNA, quando expressos, alteram a produção ou a sensibilidade das células vegetais a auxinas e citocininas, provocando uma imediata proliferação de raízes adventícias de rápido crescimento (ou no caso da *Agrobacterium tumefaciens*, a proliferação desordenadas de células formando os de tumores) na região de infecção (Zambryski et al., 1989; Flores, 1992).

A utilização do sistema *Agrobacterium* como ferramenta no processo de obtenção de RT é dependente de dois fatores importantes. Primeiramente deve haver uma relação patógeno-hospedeiro adequada (Christou 1993). Como segundo fator, pode ser citado a necessidade do desenvolvimento de sistemas de culturas de tecidos, visando obtenção de explantes com capacidade organogênica ou embriogênica e que possam ser regenerados. Então, o primeiro passo para o uso de metodologia de transformação usando-se *Agrobacterium*, é a obtenção de informações sobre a compatibilidade patógeno-hospedeiro.

A inoculação com *Agrobacterium rhizogenes*, em explantes com capacidade organogênica, constitui a base de sistemas para a obtenção de raízes e plantas transgênicas (Lacorte & Mansur, 1993). Após a transformação com o T-DNA do plasmídeo Ri, as raízes podem ser subcultivadas *in vitro* como culturas axênicas de raízes, por período de crescimento indefinido (Walden & Wingender, 1995).

2.2 - MEIO DE CULTURA PARA MANUTENÇÃO DAS RAÍZES TRANSGÊNICAS

O crescimento de células e tecidos vegetais *in vitro*, são dependentes dos nutrientes e substâncias essenciais constituintes dos meios de cultivo. Estes meios devem proporcionar aos tecidos vegetais em crescimento, as mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que ocorrem em plantas cultivadas em sistemas naturais (Torre & Caldas, 1990; Lawlor, 1991; Lindsey, 1993).

O meio de White foi desenvolvido na década de 30, tendo sido utilizado para o cultivo de várias espécies de vegetais, mesmo depois da formulação dos meios de Murashige e Skoog (MS), **B₅** e Mínimo. Estes meios se baseiam nas exigências nutricionais das plantas inteiras, com algumas modificações nos nutrientes minerais e suas fontes, vitaminas e aminoácidos, objetivando atender as necessidades específicas do crescimento do tecido vegetal no sistema *in vitro*. Enquanto às fontes de N, os meios MS e **B₅** são constituídos de NO_3^- e NH_4^+ , já o meio de White e Mínimo, possuem apenas NO_3^- como fonte de N (Murashige & Skoog 1962; Bécard & Fortin 1988; Fonseca, 1994; Berbara, 1995).

As raízes *Ri T-DNA*, são geralmente cultivadas em meio mínimo (MM), onde a fonte de N é o NO_3^- . Neste meio, o N é fornecido através do KNO_3 e $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, em níveis semelhantes ao meio de White (Berbara & Fonseca, 1996).

Bécard & Fortin (1988) discutiram a necessidade do meio de cultura ser constituído de sacarose, fósforo e sódio uma vez que as raízes não fotossintetizantes, necessitam de uma fonte externa de carbono para a

manutenção de seu metabolismo. Para o cultivo de raízes verdes *Ri T-DNA* que são fotoautotróficas, o meio pode ser constituído sem sacarose, porque essas raízes são cultivadas em ambiente com fluxo contínuo de CO_2 e luz, com a realização de fotossíntese por esses tecidos (Berbara e Fonseca, 1996).

Os meios de cultivo são constituídos de sacarose, para o fornecimento de carbono no sistema *in vitro*. No meios MM e MS, a concentração de sacarose utilizada é de 10 e 30 g / L, respectivamente.

2.3 - COMPORTAMENTO DO TECIDO VEGETAL EM SISTEMA *IN VITRO* EM DIFERENTES FONTES DE N

O NO_3^- e a NH_4^+ são as fontes de N inorgânicas mais utilizadas para o cultivo de tecido vegetal *in vitro*. O efeito dessas formas de N sobre o crescimento e desenvolvimento de culturas vegetais neste sistema de cultivo é bem diversificado (Maciel et al., 1995; Zanette et al., 1995; Sato et al., 1998).

O N pode ser fornecido apenas na forma de NO_3^- , como é o caso do meio de White e do meio Mínimo. A utilização desta forma de N pelas células vegetais depende da atividade da enzima Nitrato Redutase (NR), para redução dessa forma de N. A atividade desta enzima pode ocorrer em tecidos vegetais cultivados no sistema *in vitro*, podendo ser influenciada por fatores como a concentração de sacarose do meio de cultura e a concentração de NO_3^- (Torres & caldas, 1990).

Em raízes de tomate, a taxa de absorção de NO_3^- foi aumentada com o fornecimento de CO_2 (Gao & Lips, 1997). Segundo Cramer et al. (1993) e

Cramer & Lips (1995), a fixação de carbono inorgânico por raízes de milho e de tomate é uma importante fonte de carbono para a assimilação do N nas formas inorgânicas de NO_3^- e NH_4^+ .

Quando NH_4^+ é a única fonte de N do meio de cultura, as células de tecidos de plantas não crescem (Gamborg, 1970). Os melhores resultados foram obtidos com a mistura de $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ (Gamborg & Shyluk, 1970). A mistura de N na forma nítrica e amôniaal, como ocorre nos meios de culturas **B₅** e MS (Murashige & Skoog, 1962) são bons exemplos. O meio MS é um dos mais utilizado para o crescimento de tecidos vegetais em sistema *in vitro* (Zanette et al., 1995; Maciel et al., 1995; Abreu & Monteiro, 1998).

O N pode ser um fator limitante ao crescimento vegetal no sistema *in vitro*, dependendo da proporção das formas de N na mistura como NO_3^- e NH_4^+ , (Torre & Caldas, 1990).

O cultivo de plantas de trigo em sistema hidropônico, absorve mais N, o crescimento é rápido e apresenta uma maior produção de grãos, quando o N é suprido na proporção de $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$, na proporção de 50 : 50, do que com apenas o NO_3^- (Gentry et al., 1989).

Culturas de plantas de uma mesma espécie, podem apresentar capacidade diferenciada para o metabolismo de N na forma de NH_4^+ . Plantas de três variedades de espinafre foram cultivadas em sistema hidropônico com o fornecimento de N na proporção de $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$, 100 : 0 e 80 : 20, respectivamente. As cultivares Viroflay e Butterflay, de espinafre, apresentaram maior peso fresco de parte aérea e raízes quando cultivadas em N na proporção de 100 : 0, $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$, sendo que a cultivar Butterflay apresentou melhor desempenho. Na proporção de $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$, 80 : 20, a

cultivar Giant, apresentou maior peso fresco de parte aérea e raízes. Foi sugerido por Zornoza & Gonzáles (1998), que potencialmente existe especificidade entre as cultivares para a preferência de N e tolerância ao NH_4^+ .

As plantas de arroz são mais tolerantes à presença de NH_4^+ em baixo pH, que plantas de milho, porém, em proporções de $\text{N-NO}_3^- / \text{N-NH}_4^+$ menores que quatro, as raízes das plantas de arroz são acentuadamente reduzidas (Furlani et al., 1986).

A taxa de crescimento dos vegetais e a sua composição química, são dependentes da interação existente entre as demandas do metabolismo celular, constituição genética e das condições ambientais (Lawlor, 1991).

Não foi encontrada na literatura, qualquer referência sobre o metabolismo de N em RT ou mesmo estudos comparativos sobre morfologia e desenvolvimento de RT em diferentes meios de culturas. Como estas raízes vem sendo utilizadas para estudos de interações micorrízicas, é importante o seu conhecimento metabólico para os estudos de simbiose de FMA.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biologia do Solo do Departamento de Solos da UFRRJ, no período de 12 de maio a 30 de julho de 1997. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso, sendo os tratamentos amostrados em um fatorial 4 x 2 (quatro meios de culturas e duas espécies de raízes, cenoura e trevo), com três repetições.

3.1.1- Obtenção das raízes

As RT de cenoura (*Daucus carota* L.) e trevo (*Trifolium repens* L.), foram transformadas geneticamente por Fonseca (1994), através da infecção das células destes vegetais pela *Agrobacterium rhizogenes*, em que o DNA de transferência oriundo do plasmídeo bacteriano Ri, induziu a proliferação de raízes.

Para manutenção das RT é necessário a repicagem periódica desse tecido vegetal, em placas de Petre com meio mínimo.

3.1.2 - Escolha dos meios

Utilizou-se como meio padrão para o cultivo das raízes, o meio, mínimo (Tabelas 1, 2 e 3), por ter possibilitado, em outros trabalhos, um considerável desenvolvimento desse tecido vegetal (Bécard & Fortin, 1988; Fonseca, 1994; Berbara, 1995).

O segundo meio escolhido foi o MS (Murashige & Skoog, 1962), por este ser utilizado para o cultivo de células vegetais em sistema *in vitro* e apresentar em sua composição a mistura de $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ e não apenas o NO_3^- como no meio mínimo. Além destas fontes de N inorgânicas, foram escolhidas duas fontes orgânicas: o citrato de NH_4^+ (Marciel et al., 1995; Zanette et al., 1995) e a uréia (Granick, 1937; Matsumoto et al. 1966; Polacco, 1976; Zago, 1997).

O meio mínimo, considerado como padrão, foi mantido sem modificações. O meio MS, contendo uma mistura de $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$, também foi mantido as concentrações de nutrientes e fontes destes. As fontes de N orgânicas, tinham concentração semelhante de N a do meio mínimo, ou seja, a concentração de N-nítrico do meio mínimo foi substituída por equivalente concentração de N como citrato de NH_4^+ ou uréia (Tabelas 1, 2 e 3).

Tabela 1 - Composição dos diferentes meios de cultivo das RT de cenoura e de trevo

	Mínimo	MS	Mínimo Citrato*	Mínimo Uréia*
MACRONUTRIENTES				
	mg.L⁻¹			
NH ₄ NO ₃		1 650		
KNO ₃	80	1 900		
CaCl ₂ .2H ₂ O		440		
MgSO ₄ .7H ₂ O	731	370	731	731
KH ₂ PO ₄	4,8	170	4,8	4,8
KCl	65		72,39	72,39
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	228			
CaCO ₃			96,58	96,58
K ₂ SO ₄			120,23	120,23
(NH ₄) ₂ .C ₆ H ₆ O ₇			308,08	
NH ₂ CONH ₂				81,68
MICRONUTRIENTES				
MnSO ₄ .4H ₂ O	6	22,3	6	6
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,65	8,6	2,65	2,65
H ₃ BO ₃	1,5	6,2	1,5	1,5
KI	0,75	0,83	0,83	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0024	0,25	0,0024	0,0024
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,13	0,025	0,13	0,13
CoCl ₂ .6H ₂ O		0,025		
OUTROS				
Na ₂ EDTA.2H ₂ O		37,3		
NaFe EDTA	8		8	8
FeSO ₄ .7H ₂ O		27,8		
Glicínia	3	3	3	3
Ácido nicotínico	0,5	0,5	0,5	0,5
Piridoxina.HCl	0,1	0,1	0,1	0,1
Tiamina.HCl	0,1	0,1	0,1	0,1
Mio-inositol	50	50	50	50
Sacarose	5.000	5.000	5.000	5.000
Gel-gro	5.000	5.000	5.000	5.000

*O meio que continha NO₃⁻ + NH₄⁺ constitui o meio Murashige & Skoog - MS. De um modo geral, todos os meios restantes foram formulados a partir do meio mínimo - MM (NO₃⁻) com algumas modificações. O pH 5,8 foi ajustado para todos os meios.

Tabela 2 - Concentração dos nutrientes utilizados na formulação dos meios de cultivo das RT de cenoura e de trevo.

Nutrientes	Mínimo	MS	Mínimo Citrato	Mínimo Uréia
	mM			
N	2,720	60,03	2,720	2,720
P	0,035	1,249	0,035	0,035
K	1,701	20,045	2,391	2,391
Mg	2,965	1,501	2,965	2,965
S	2,975	1,728	3,665	3,665
Mn	0,030	0,099	0,030	0,030
Ca	0,965	2,994	0,965	0,965
Cl	0,9326	5,987	1,0316	1,0316
I	0,004	0,005	0,005	0,005
Zn	0,009	0,029	0,009	0,009
B	0,024	0,100	0,024	0,024
Cu	$0,5 \times 10^{-3}$	$0,1 \times 10^{-3}$	0,005	0,005
Mo	$0,9 \times 10^{-5}$	0,001	$0,9 \times 10^{-5}$	$0,9 \times 10^{-5}$
Fe	0,0216	0,099	0,0216	0,0216
Na	0,021	0,102	0,01	0,021
Co		$0,1 \times 10^{-3}$		

Tabela 3 - Concentrações e proporções de cada fonte de N nos meios utilizados na formulação dos meios de cultivo das RT de cenoura e de trevo.

Meios	Fontes de N (mg N/litro)		Proporção
	NO_3^-	NH_4^+	$\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$
MS	551,75	288,75	66 : 34
Mínimo	38,59	-	100 : 0
Mínimo Citrato	-	38,26	0 : 100
Mínimo Uréia	-	38,12	0 : 100

Objetivando avaliar o comportamento das RT de cenoura e de trevo, para posteriores estudos do metabolismo de N em associações com FMA, as concentrações de sacarose dos meios foram reduzidas para 5 g/L e ajustado a pH 5,8 com a finalidade de induzir um maior estresse e antecipar a senescência das RT.

Os quatro meios foram devidamente preparados e vertidos em placas de Petri (15 cm X 1,5 cm) com capacidade de 55 ml de meio, em seguida estas foram seladas com parafilme e estocadas para a repicagem das raízes.

Um segmento de aproximadamente 2,5 cm de raiz transformada de cenoura (*Daucus carota* L.) ou de trevo (*Trifolium repens* L.), foi repicado em cada placa de Petri contendo o meio de cultura. Em seguida, as placas foram seladas com parafilme e estocadas em câmara termostática com temperatura constante de 22°C, na ausência de luz.

3.2 - DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA RADICULAR

3.2.1 - Crescimento das raízes

Após a repicagem das raízes, estas foram avaliadas quanto ao crescimento, a cada quatro dias, durante os 28 primeiros dias, através da adaptação de alguns métodos onde se contou a interceptação das raízes em área de 0,25 **cm²** (Tennant, 1975; Rossiello et al., 1995).

O monitoramento do crescimento das raízes foi efetuado apenas nos primeiros 28 dias, devido o grande desenvolvimento das RT nos meios mínimo e MS, mas ambas as raízes de cenoura e de trevo foram cultivadas por um período de 81 dias.

3.2.2 - Peso Fresco Total de Raízes

Antes das análises laboratoriais, as raízes de cada tratamento foram retiradas das placas com meio, com o auxílio de uma pinça e determinou-se o peso fresco total das raízes de cada repetição.

3.3 - Extração alcoólica no material fresco

Após a determinação do peso fresco, cerca de 0,5 g de raízes foram colocadas em 20 mL de etanol 80 % e armazenadas em frascos âmbar, para posterior extração das porções solúveis. Cada amostra armazenada em etanol,

foi colocada em almofariz e triturada com pistilo por 3 min. Todo o material foi passado em 4 camadas de gaze e papel de filtro. Posteriormente, foi transferido para funil de separação onde se adicionou igual volume de clorofômio. Após agitação suave, foi deixado em repouso por 40 minutos, quando descartou-se a fração apolar e a fração polar foi elevada a um volume de 25 ml com etanol 80 % e guardada para análise de N-amino livre, N-NH_4^+ , N-NO_3^- e açúcares solúveis.

3.3.1 - Determinação de N-amino

A determinação foi realizada em tubo pirex com 0,5 mL de tampão citrato (0,2 M, pH 5,0), 1mL da solução obtida do extrato alcoólico (diluídas quando necessário), adicionou-se 1,2mL do reagente metil celossolve + KCN + ninidrina e agitando-se em seguida. Todos os tubos foram fechados com papel alumínio e colocados para aquecer em banho-maria a 100°C por 15 minutos. Após esse período, os tubos com as amostras foram esfriadas em água corrente por 5 minutos, quando então acrescentou-se 3 ml de etanol 60%, agitando para homogeneizar e efetuou-se a leitura em 570 nm contra padrão de leucina (Yemm & Cocking 1955).

3.3.2 - Determinação de açúcares solúveis

Em tubos pirex de 2,5 cm de diâmetro imersos em banho de gelo, foi

colocado 5 mL do reagente de antrona (2% em H_2SO_4 - 5:2), e após 5 minutos de repouso, adicionou-se lentamente de 0,2 a 1,0 mL da solução problema (conforme a concentração da mesma, completando o volume para 1,0 mL com etanol 80%) ou padrão, deixando-se em repouso por 5 minutos em temperatura de 0°C. Em seguida, as amostras foram misturadas suavemente e colocadas em banho-maria a 100°C por 10 minutos para o desenvolvimento da cor verde. Após esfriarem em água corrente foram efetuadas as leituras em 620 nm, contra o padrão de glicose (Yemm & Willis, 1954).

3.3.3 - Determinação de N-nitrato

Uma alíquota de 0,1 mL da amostra foi pipetada para tubo pirex onde foi vagarosamente adicionado 0,4 mL da solução de ácido salicílico 5% em H_2SO_4 concentrado. Deixando-se em repouso por 20 minutos em temperatura ambiente, acrescentou-se lentamente 9,5 mL de NaOH 2N e após esfriar, efetuou-se a leitura em 410 nm, contra padrão de KNO_3 (ug de /0,1 mL) (Cataldo et al., 1975).

3.3.4 - Determinação de N-amônio

A determinação de N na forma de amônio, foi realizada através do método de Mitchell (1972), sendo a solução de hipoclorito de sódio substituída por dicloroisocianurato de sódio (Felker, 1977), pois em clima tropical, a

solução de hipoclorito perde rapidamente seu poder oxidante. A determinação foi realizada através de duas soluções. Uma solução constituída de fenol mais nitroprussiato de sódio (1:5) e a outra, composta de 15g de NaOH mais 0,3lg de dicloroisocianurato de sódio. Alíquota de 0,5mL da amostra ou padrão foram acrescentadas à 2,5 mL de cada solução, após homogeneização e descanso por 30 minutos, as amostras foram lidas em 630nm contra padrão de NH_4Cl (5mM).

3.4 - Atividade das Proteases

Para a determinação da atividade das proteases utilizou-se a metodologia de Jones et al. (1995). Imediatamente após a coleta das raízes, foi pesado 1 g de material, colocado em almofariz acrescentando-se N_2 líquido. Em seguida, colocou-se 3mL de Tampão de Extração (EDTA, ácido ascorbico, B-mercaptoetanol, dissolvidos em tampão fosfato 50 mM pH 7,0). O material foi filtrado em quatro camadas de gaze e centrifugado sob refrigeração (20.000g / 25 minutos). O sobrenadante contendo o extrato de protease foi separado e deixado em temperatura de 4°C, até o momento do ensaio.

Para a dosagem das proteases, colocou-se em tubo de ensaio 1,8 mL de solução de albumina (1 mg/mL) mais 0,2 mL do extrato de protease. Incubou-se as amostras em banho-maria à 30°C em diferentes períodos: 0, 30, 60 e 120 minutos, em que a atividade dessas enzimas foi detectada em ensaio preliminar.

A reação foi paralisada pelo acréscimo de 1,0 mL do ácido tricloroacético 15%, no tempo zero antes da albumina. Em seguida, a mistura

foi homogeneizada e deixada em temperatura ambiente por 15 minutos. A mistura foi centrifugada a 1200g por 10 minutos, com a finalidade de precipitar as proteínas. O sobrenadante foi coletado e determinou-se o teor de aminoácidos formados pelo ensaio da Ninidrina (Moore & Stein, 1954).

3.4.1 - Proteína do extrato enzimático

A proteína das proteases foi determinada através do método de Bradford (1976). Em tubo pirex foi acrescentado 0,1 mL do extrato protéico e 5mL de solução de Coomassie Blue G-250 (200mg de Coomassie Blue, 100mL de etanol 95% e 200mL de Ácido Fosfórico 85%, para um volume de 2000mL) e efetuada a leitura, imediatamente, à 595nm, contra padrão de albumina, de soro bovino.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

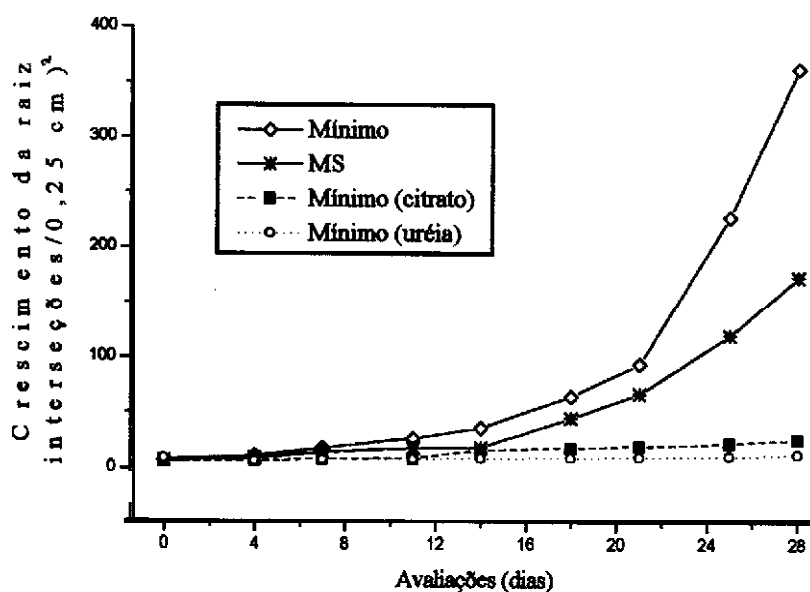
4.1 - DESENVOLVIMENTO DAS RAÍZES

4.1.1 - Crescimento das raízes

Acompanhando o crescimento das RT de cenoura e de trevo nos primeiros 28 dias de cultivo, observou-se melhor desenvolvimento nos meios com fonte de N inorgânica, mínimo ou MS (Figura 1). Segundo Lawlor (1991) a taxa de crescimento das espécies vegetais é dependente da interação entre a demanda do metabolismo, da constituição genética e das condições em que essa espécie foi desenvolvida.

Nos meios com fonte de N orgânica, mínimo modificado com citrato de NH_4^+ ou uréia, o desenvolvimento das RT foi reduzido (Fotos 1, 2, 3 e 4). Suspensão de cultura de células de tabaco, alfafa e trigo, exibiram respostas de crescimento diferenciado para o suprimento de ácidos intermediários do ciclo tricarboxílico, dependendo da concentração e da fonte de N (Fukunaga et al., 1978).

Cenoura



Trevo

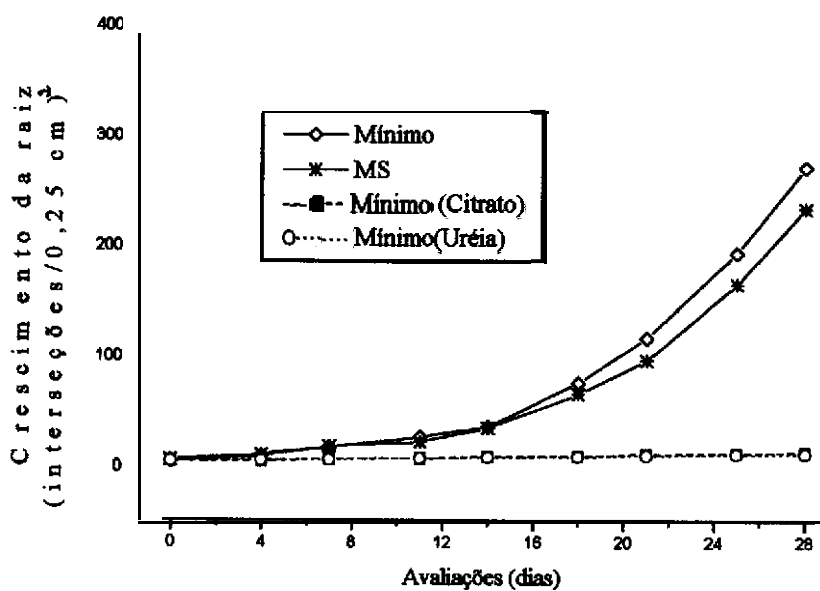


Figura 1. Crescimento das raízes transgênicas de cenoura e trevo (interseções/0,25 cm²) nos primeiros 28 dias de cultivo em diferentes meios.

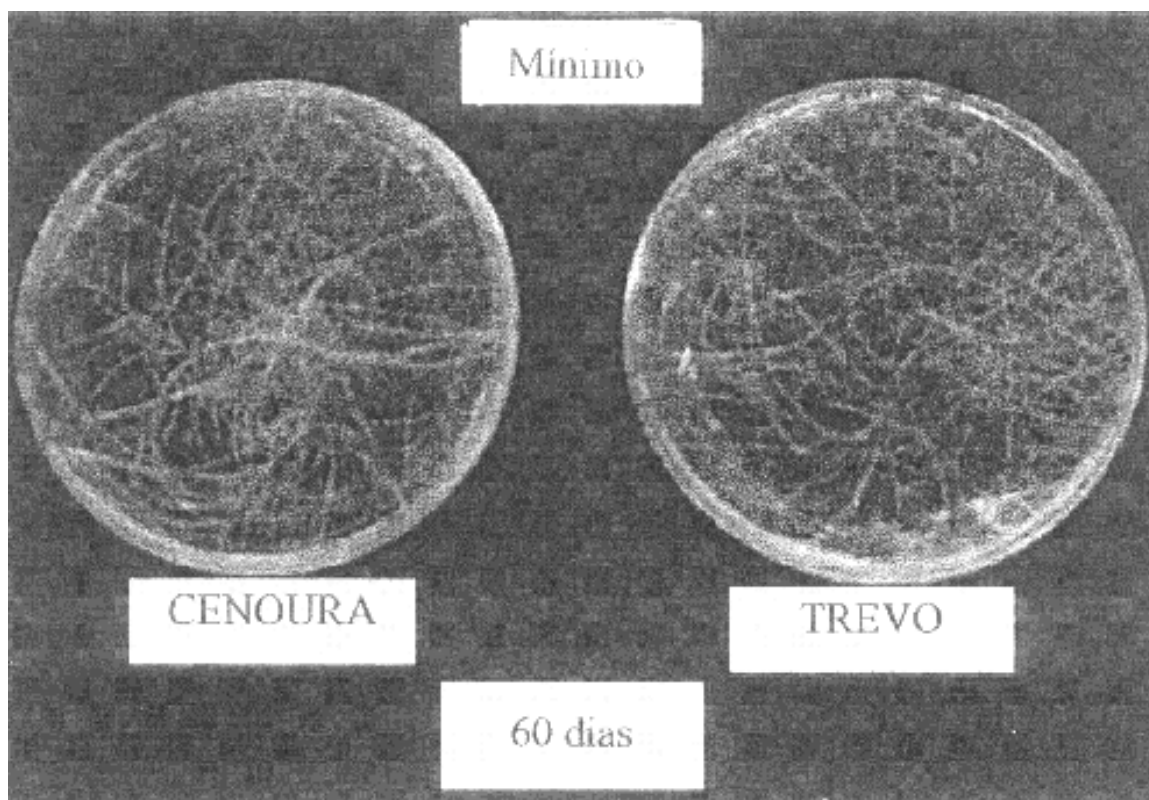


Foto 1. Crescimento das raízes transgênicas de cenoura e de trevo em meio mínimo.

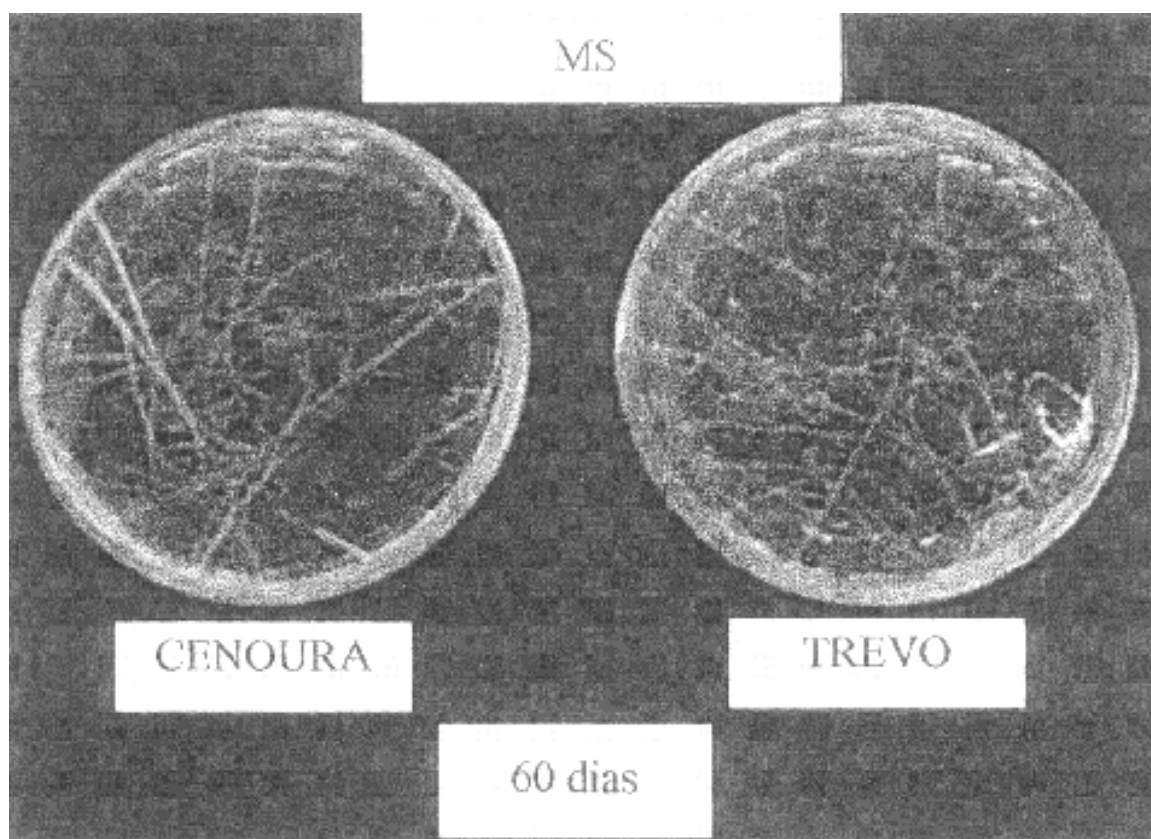


Foto 2. Crescimento das raízes transgênicas de cenoura e de trevo em meio MS.

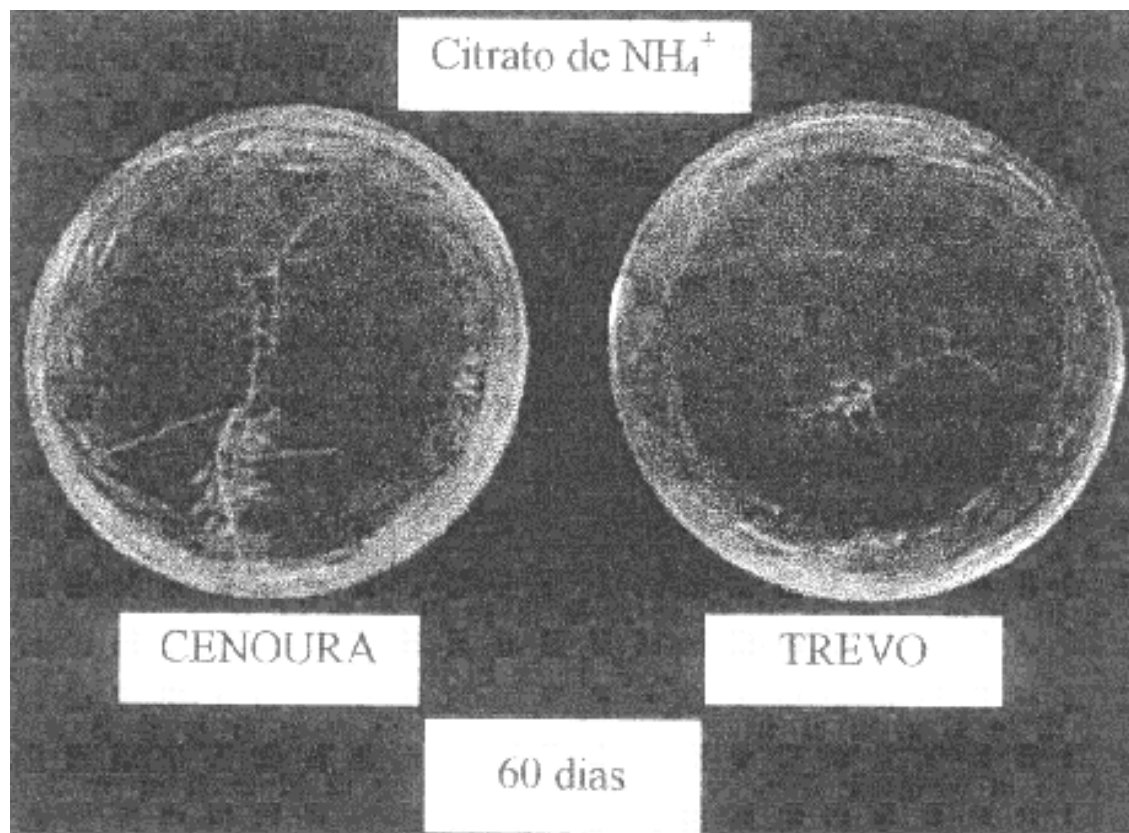


Foto 3. Crescimento das raízes transgênicas de cenoura e de trevo em meio mínimo com citrato de NH_4^+ .

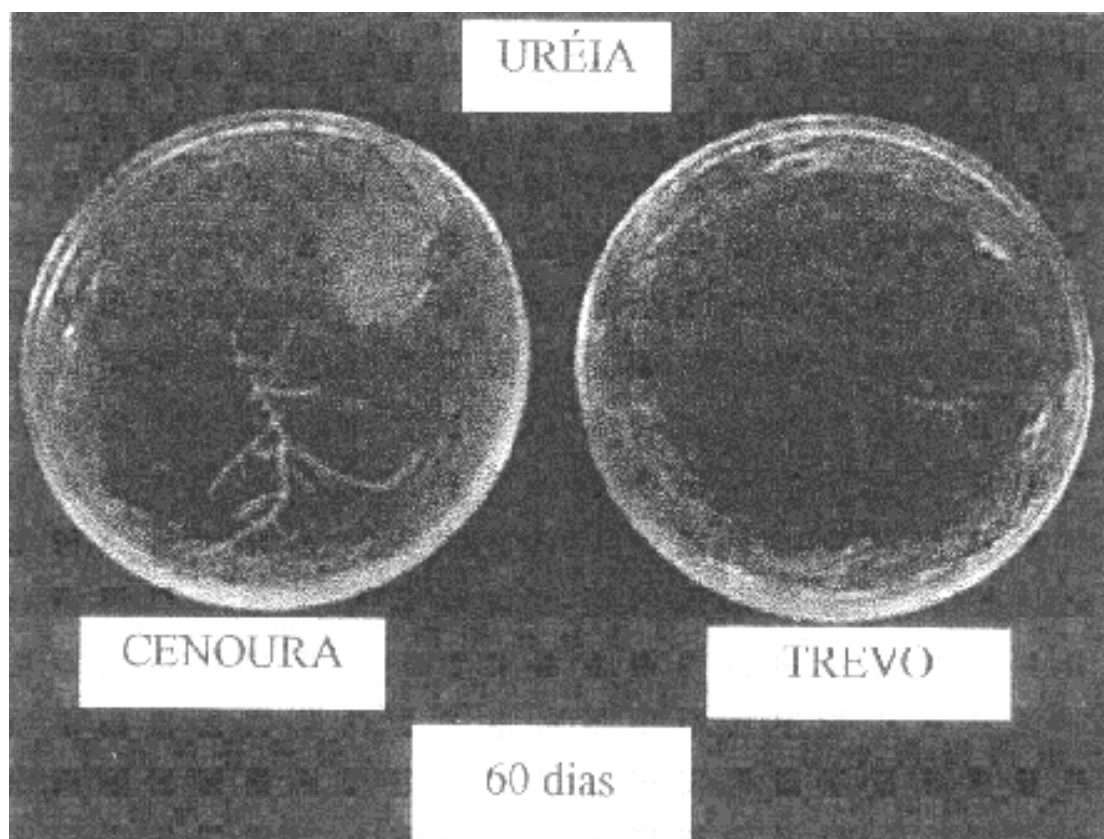


Foto 4. Crescimento das raízes transgênicas de cenoura e de trevo em meio mínimo com uréia.

O meio de cultura que proporcionou as melhores condições para o crescimento das RT foi aquele cuja única fonte de N foi a nítrica, sendo o crescimento mais acentuado nas raízes de cenoura.

Nos meios de cultura mínimo e MS, as raízes desenvolveram-se rapidamente por toda a placa de Petri e com o tempo sobrepunham-se umas as outras, impedindo o monitoramento do crescimento após os 28 dias de cultivo (Fotos 1 e 2)

4.1.2 - Peso fresco total das raízes

O peso fresco (pf) das RT de cenoura e de trevo aos 81 dias, apresentou maior desenvolvimento com as fontes de N inorgânicas, meio mínimo e MS (Figura 2). Estes resultados reforçam a afirmação de que, apesar das plantas superiores serem capazes de absorver N em formas orgânicas e inorgânicas, o N na forma inorgânica proporciona maior desenvolvimento dos tecidos vegetais (Gamborg & Shyluk, 1970; Lindsey, 1993).

Das duas formas inorgânicas de N, o meio mínimo na forma nítrica proporcionou maior crescimento e peso fresco das RT, tanto de cenoura como de trevo (Figuras 1 e 2). Com o aumento da concentração do N na forma nítrica foi observado por Schontz et al., (1989) que a matéria seca de *Trifolium repens* L., também aumentou.

A maior concentração de N do meio MS, não se refletiu em maior rendimento das raízes cultivadas neste meio. Provavelmente neste meio o teor de N estava na faixa de consumo de luxo. Segundo Sato et al. (1998), a

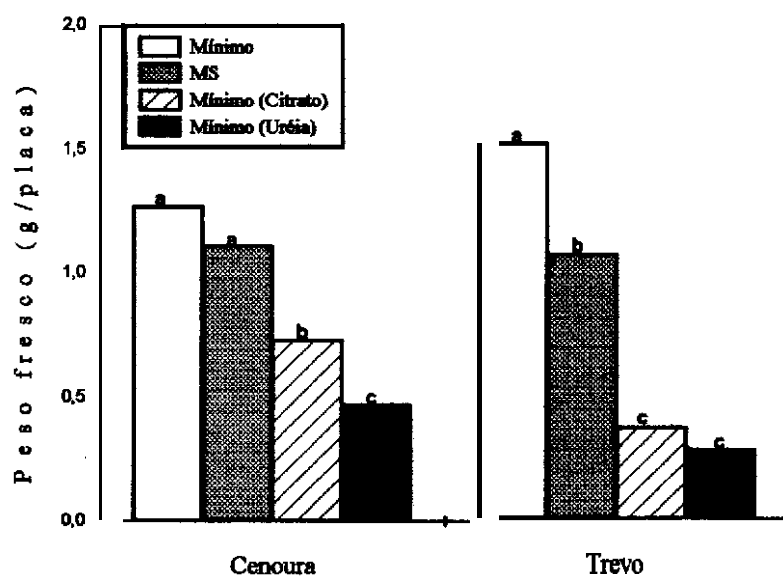


Figura 2. Peso fresco das raízes transgênicas de cenoura e trevo (g/placa) aos 81 dias de cultivo em diferentes meios.

Letras iguais para a mesma raiz, não diferem significativamente entre si (Teste Tukey, $p < 0,05$).

concentração de NO_3^- e NH_4^+ do meio MS pode ser tóxica para algumas espécies. Por outro lado, a proporção das formas de N na mistura $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ do meio MS, pode ser um fator limitante no crescimento do vegetal neste sistema de cultivo (Sargent & King, 1974; Gentry et al., 1989). O meio MS, contém uma proporção de aproximadamente 2:1 de NO_3^- para NH_4^+ . O excesso de N amoniacal, pode ter induzido toxidez às raízes, influenciando assim, no menor peso fresco em comparação ao meio com apenas NO_3^- , meio mínimo. Resultados similares foram obtidos em raízes não transgênicas de arroz, que também apresentaram reduções no crescimento em meio onde a relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ era menor do que 4 (Furlani et al., 1986).

4.2.1. Teor de N-amino-livre

As raízes de cenoura e de trevo, cultivadas no meio de cultura com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ apresentaram os maiores teores de N-amino livre. Os demais tratamentos foram praticamente semelhantes entre si. As raízes de cenoura apresentaram aproximadamente 91 μmoles N-amino/g pf, enquanto que as raízes de trevo, apresentaram um pouco menos que a metade deste valor (Figura 3).

Os maiores teores de N-amino livre para as raízes de cenoura e de trevo, ocorreram quando as raízes foram cultivadas no meio com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ que continha elevada concentração de N em relação aos demais meios.

Possivelmente, o alto teor de N-amino livre destas raízes esteja relacionado com a alta concentração de N, já que o acúmulo de nitrato, pode

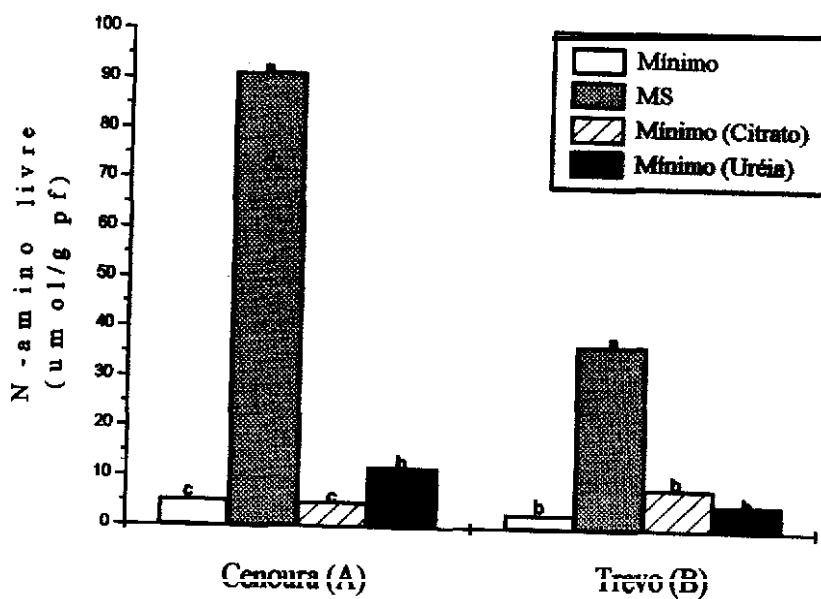


Figura 3. Teor de N-amino livre em raízes transgênicas de cenoura e trevo ($\mu\text{mol/g pf}$) aos 81 dias de cultivo em diferentes meios.

Letras iguais para a mesma raiz, não diferem significativamente entre si (Teste Tukey, $p < 0,05$).

ocorrer em condições de excesso de absorção de N (Femandes, 1991).

O meio com apenas o NO_3^- , foi o que apresentou o menor teor de N-amino livre, com valores médios de 4 μmoles de N-amino/g pf (Figura 3). Entretanto, nesta fonte de N, as RT apresentaram maior crescimento e peso fresco (Figuras 1 e 2). Provavelmente, nestas condições as raízes incorporaram os aminoácidos para a produção de biomassa.

O meio mínimo, com apenas NO_3^- como fonte de N, é utilizado em alguns trabalhos de simbiose micorrízica, e apesar do metabolismo não ser conhecido, sabe-se que essas raízes apresentam um crescimento satisfatório nesse meio (Fonseca, 1994; Berbara, 1995).

4.2.2 - Teor de açúcares solúveis

Tanto, as raízes de cenoura como as de trevo, apresentaram maior acúmulo de açúcares solúveis nos meios de cultura com N orgânico e menor acúmulo nos meios de cultura com N inorgânico (Figura 4).

As RT de cenoura aos 81 dias do cultivo nas fontes de N orgânicas, apresentaram em média 27 e 35 mg/g pf de açúcares solúveis, para citrato e uréia, respectivamente.

As raízes de cenoura e de trevo, quando cultivadas no meio com apenas nitrato como fonte de N, acumularam baixos teores de açúcares solúveis e de N-amino livre. (Figuras 3 e 4)

Considerando que as raízes apresentaram maior produção de biomassa no meio com apenas nitrato como fonte de N, possivelmente os açúcares

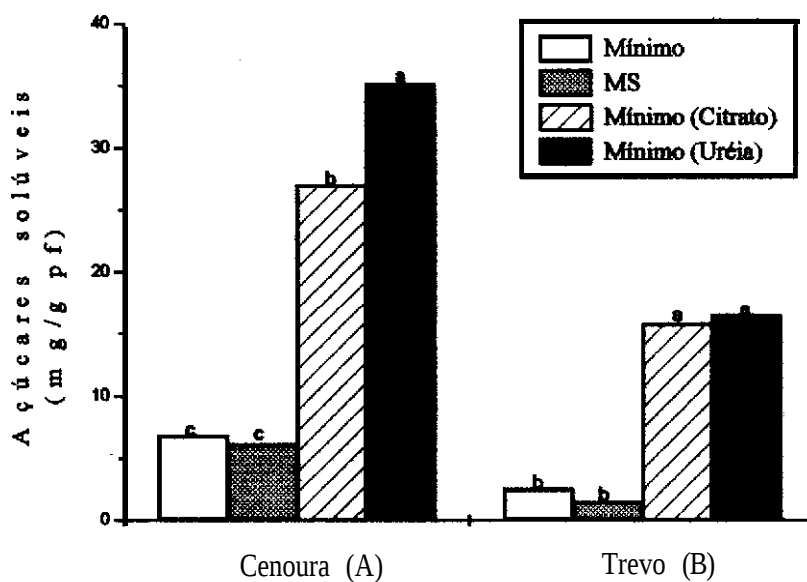


Figura 4. Teor de açúcares solúveis em raízes transgênicas de cenoura e trevo (mg/g pf) aos 81 dias de cultivo em diferentes meios. Letras iguais para a mesma raiz, não diferem significativamente entre si (Teste Tukey, $p < 0,05$).

solúveis foram utilizados para a redução do NO_3^- , assimilação do amônio e produção de biomassa (Figura 1, 2, 3, 4). No meio de cultura com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$, os teores de N-amino nas raízes de cenoura e de trevo, foram altos e os de açúcares solúveis baixos. Provavelmente, o teor de açúcares solúveis não foi suficiente para incorporar o N assimilado em tecido vegetal.

As RT de cenoura e de trevo quando cultivadas em fontes de N orgânicas, apresentaram baixos teores N-amino livre e altas concentrações de açúcares solúveis e reduzido crescimento, em relação as demais fontes de N (Figuras 3 e 4). O maior acúmulo de açúcares solúveis nas raízes, indica que a energia disponível não foi utilizada para a redução do N (Fernandes & Rossiello, 1995).

4.2.3 - Teor de N-nitrato

A presença de N-nitrato nas raízes de cenoura e de trevo foi detectada apenas quando NO_3^- estava na composição do meio (Figura 5).

O maior acúmulo de nitrato nas duas espécies de RT cultivadas no meio com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ pode ser atribuído a maior concentração de N nesta forma, em relação ao meio com apenas NO_3^- . Comportamento semelhante foi observado por Gentry et al. (1989). As raízes podem acumular nitrato, quando sua absorção excede a capacidade de redução. (Lewis & love, 1994; Gunes et al., 1996).

As plantas acumulam o excesso de NO_3^- no vacúolo e o teor de nitrato acumulado nos vegetais é variável, podendo chegar a mais de 1% da matéria

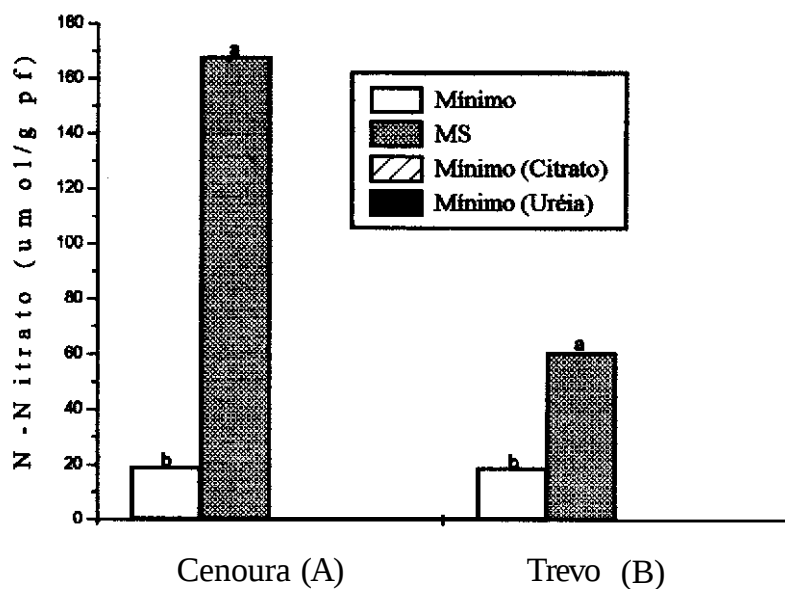


Figura 5. Teor de N-nitrato em raízes transgênicas de cenoura e trevo (umol/g pf) aos 81 dias de cultivo em diferentes meios. Letras iguais para a mesma raiz, não diferem significativamente entre si (Teste Tukey, $p < 0,05$).

seca, embora, tenha sido determinado em folhas de canola mais de 2,2 % (Srivastava & Fletcher, 1992).

4.2.4 - Teor de N-amônio

As raízes de cenoura e de trevo, acumularam em média 1,51 $\mu\text{mol/g}$ pf de N-amônio no meio com apenas NO_3^- (Figura 6). Entretanto, quando as raízes foram cultivadas no meio com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$, houve acúmulo de 17,73 e 39,07 $\mu\text{mol/g}$ pf de N-amônio nas raízes de cenoura e de trevo, respectivamente.

Nos meios com citrato de NH_4^+ e uréia, não foi detectado acúmulo de N- NH_4^+ possivelmente devido ao reduzido nível de N na composição desses meios. Por outro lado, no meio de cultura constituído com a mistura de $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$, as RT apresentaram maiores teores de N - NH_4^+ , provavelmente devido a maior concentração desse íon neste meio. Resultados similares foram observados por Zago (1997) em couve que apresentou aumento de N- NH_4^+ proporcional a doses crescentes de uréia fornecida.

As RT de cenoura e de trevo, acumularam mais nitrogênio na forma de N- NO_3^- e de N- NH_4^+ quando cultivadas em meio com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$, do que no meio com apenas o N na forma nítrica, ou nas formas orgânicas. Solbritt et al. (1996), também observaram um maior acúmulo de N em raízes de *Pinus sylvestris* L. que receberam N na forma inorgânica do que em forma orgânica.

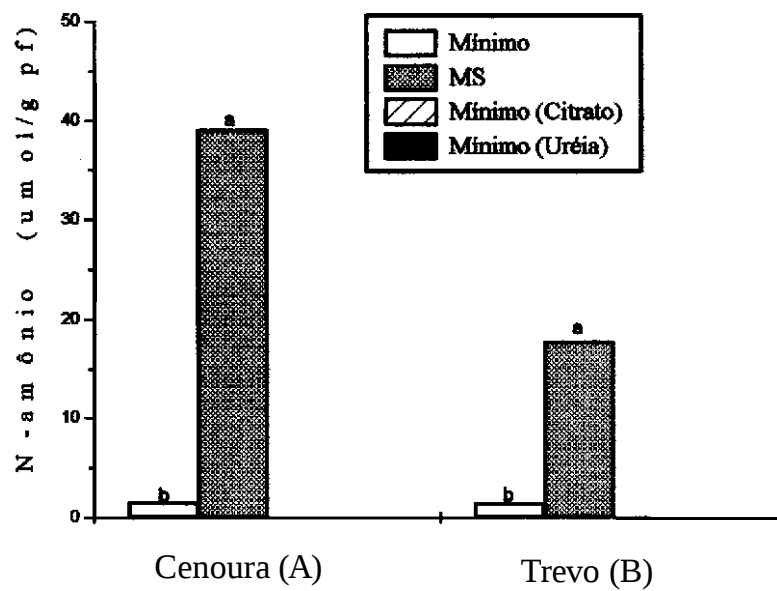


Figura 6. Teor de N-amônio em raízes transgênicas de cenoura e trevo (umol/g pf) aos 81 dias de cultivo em diferentes meios. Letras iguais para a mesma raiz, não diferem significativamente entre si (Teste Tukey, $p < 0,05$).

4.4 - Atividade das Proteases e Teor de Proteína do extrato enzimático.

A atividade da protease foi determinada aos 60 min. e aos 120 min. de incubação. Como pode ser observado nas Figuras 7 e 8 a atividade enzimática foi detectada tanto para a cenoura como para o trevo em todas as fontes de N aos 60 minutos, exceto, quando a fonte de N foi $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ onde se observou atividade da protease somente aos 120min.

Aos 120 minutos quando as RT foram cultivadas em meio MS, a maior atividade das proteases sugere uma possível situação de estresse, que pode ter sido responsável pelo menor crescimento obtido neste meio em comparação com o meio mínimo, apesar do meio MS apresentar maior teor de N. Possivelmente, a redução de carbono limitou a assimilação deste nutriente.

Tal observação confirma resultados que indicam resposta de crescimento negativo em plantas desenvolvidas nestas condições (Furlani et al., 1986; Gentry et al., 1989; Zornoza & Gonzáles, 1998) e de que o meio $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ pode ser tóxico (Sato et al., 1998).

Quando se compara a atividade das proteases com a quantidade de proteína obtida do extrato enzimático (Figuras 7 e 8) pode-se observar que a atividade da enzima não se deve a presença de maior teor de proteína enzimática, uma vez que maior atividade foi obtida para o meio $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ enquanto que, as maiores quantidades de proteína enzimática ocorreu nos meios com N-orgânico, tanto para a cenoura como para o trevo. Provavelmente, este comportamento esta relacionado ao desenvolvimento lento das raízes cultivadas em fontes de N orgânico, em comparação com o N-inorgânico (Fotos 1, 2, 3 e 4).

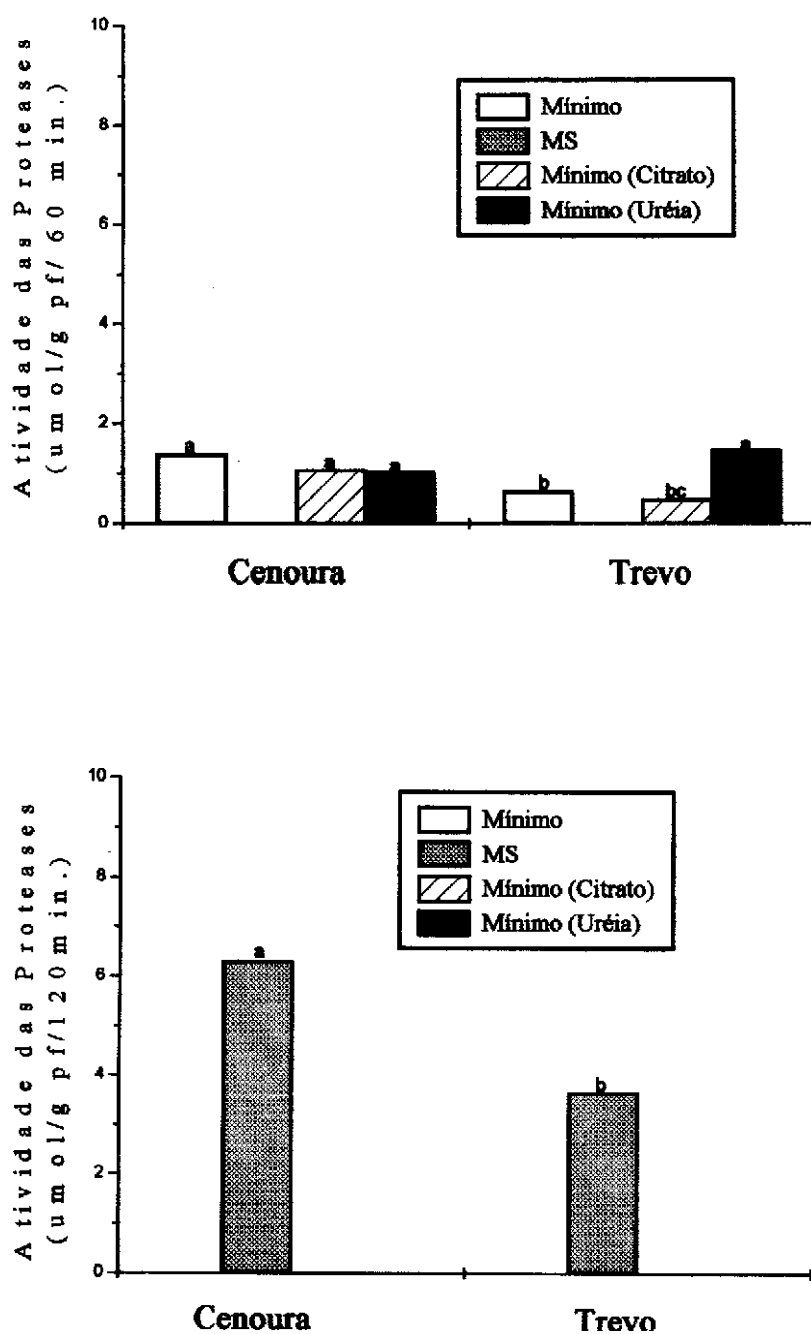


Figura 7. Atividade das proteases (umol/g pf) aos 60 e 120 minutos de incubação, em raízes transgênicas de cenoura e trevo aos 81 dias de cultivo em diferentes meios. Letras iguais para a mesma raiz, não diferem significativamente entre si (Teste Tukey, $p < 0,05$).

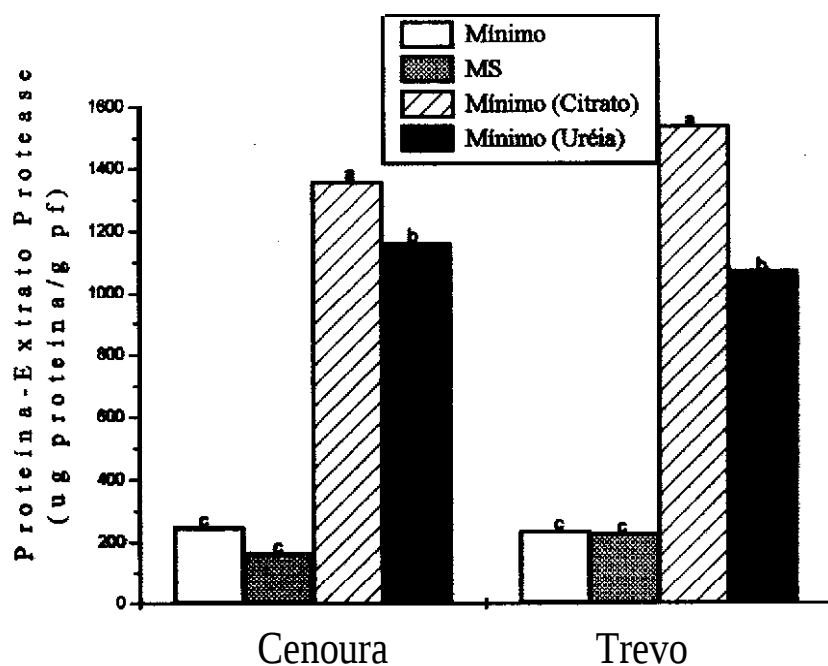


Figura 8. Quantidade de proteína do extrato de proteases (ug/g pf) em raízes transgênicas de cenoura e trevo aos 81 dias de cultivo em diferentes meios. Letras iguais para a mesma raiz, não diferem significativamente entre si (Teste Tukey, $p < 0,05$).

Segundo Buchanan-Wollaston (1997) as proteases podem estar presentes nos tecidos em formas não ativas, tomando-se ativas em formação de estresse ou senescência (que também é um tipo de estresse). De acordo com os resultados observados para as raízes de cenoura e de trevo, a presença de altos teores de proteínas enzimáticas (meios com citrato de amônio e uréia) não implicam em alta atividade das enzimas proteases. Por outro lado, no meio com apenas NO_3^- , o teor de proteína foi baixo, mas a atividade enzimática foi similar a obtida para os meios com uréia ou citrato de amônio. Porém, no meio com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ houve alta atividade de protease, mas o teor de proteínas enzimáticas baixo (com valor próximo ao encontrado para o meio com NO_3^-) (Figuras 7 e 8).

Estes resultados indicam que a atividade das proteases pode ser acionada por condições de estresse relacionadas com o excesso de NH_4^+ , como observado quando as raízes cultivadas no meio com elevado teor de N na forma de $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$

5 - CONCLUSÕES

As raízes transgênicas de cenoura e de trevo, apresentaram maior produção de biomassa quando cultivadas em meio com N-mineral, em níveis não tóxicos.

De acordo com os resultados obtidos, os meios mais propícios à propagação de RT de cenoura e de trevo seriam os que tivessem N na forma inorgânica meio mínimo e MS. Entretanto, a utilização desses, deve estar condicionada ao uso experimental das mesmas, pois ocorre aumento da atividade das proteases nessas condições.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIAS

- ABREU, J. B. R.; MONTEIRO, F. A. Efeito de doses de nitrogênio na produção da parte aérea e raiz dos capins gordura, marandu e tanzânia-1. Resumo. FertBIO-98, XXIII Reunião Bras. Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, VII Reunião Brasileira sobre Micorrizas, V Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo e II Reunião Brasileira de Biologia do Solo. Caxambu, MG. 11 a 16 de outubro de 1998, p.695, 1998.
- ANDRADE, W. E. B.; FERNANDES, G. M. B.; AMORIM NETO, S. Qualidade nutricional do arroz em função de doses crescentes de nitrogênio. Resumo da FertBIO-98, XXIII Reunião Bras. Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, VII, Reunião Brasileira sobre Micorrizas, V Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo e II Reunião Brasileira de Biologia do Solo. Caxambu, MG. 11 a 16 de outubro de 1998, p.52, 1998.
- BALSBERG-PAHLSSON, A. M. Influence of nitrogen fertilization on mineral, carbohydrates, amino acids phenolic compounds in *beech* (*Fagus sylvatica* L.) leaves. **Tree Physiol.** v. 10, n. 1, p.93-100, 1992.
- BÉCARD, G.; DOUDS, D. D.; PFEFFER, P. E. Extensive *in vitro* growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO₂ and flavonols. **Applied Environment Microbiology**, v.58, p.821-825, 1992.

- BÉCARD, G.; FORTIN, J. A. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on *Ri T-DNA* Transformed roots. **New Phytologist**, v. 108, p. 211-218, 1988.
- BERBARA, R. L. L. Ionic fluxes in arbuscular mycorrhizal systems. PhD. Thesis, University of Dundee, 1995. 215p. (Tese Ph.D.)
- BERBARA, R. L. L.; FONSECA, H. M. A. C. Colonização radicular e esporulação de fungos micorrízicos arbusculares *in vitro*. In: SIQUEIRA, J. O. Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas. ed. Lavras: Universidade Federal de Lavras / DCS e DCF, p. 39-66, 1996.
- BLAND, W. L.; MESARCH, M.A. Counting error in the line-intercept method of measuring root length. **Plant and soil**, The Hague, v. 125, p. 155-157, 1990.
- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72:248-254, 1976.
- BRASILEIRO, A. C. M. Biologia de *Agrobacterium* sp. **ABCP Notícias**, 20: p.2-6, 1993.
- BUCHANAN-WOLLASTON, The molecular biology of leaf senescence. **Journal of Experimental Botany**, v.48, p. 181-199, 1997.
- CALDAS, R. A.; CALDAS, L. S. Nitrate, ammonium and kinetin effects on growth and enzyme activities of Paul's Scarlet Rose callus. **Physiol Plant.**, v.37, p.111-116, 1976.
- CATALDO, D. A.; HAROON, M.; SCHRADER, L.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Comm. Soil Sci. Pl. Anal.**, v.6, n.1, p.71-80, 1975.
- CHRISTOU, P. Particle gun mediated transformation. **Current Opinion in Biotechnology**, v.4, p.135-141, 1993.
- CRAMER, M. D.; LEWIS, O. A. M.; LIPS, S. H. Inorganic carbon fixation and metabolism in maize roots as affected by nitrate and ammonium nutrition. **Physiol. Plant.** v.89, p.632-639, 1993.

- CRAMER, M. D.; LIPS, S. H. Enriched rhizosphere CO₂ concentrations can ameliorate the influence of salinity on hydroponically grown tomato plants. **Physiologia Plantarum**, v.94, p.425-432, 1995.
- De BLOCK, The cell biology of plant transformation: current state, problems, prospects and the implication for the plant breeding. **Euphytica**, v.71, p.1-14, 1993.
- FARRELL, R. E.; WALLEY, F. L.; LUKEY, A. P.; GERMIDA, J. J. Manual and digital line-intercept methods of measuring root length: A comparison. **Agronomy Journal**. Madison, v. 85, p. 1233-1237, 1993.
- FELKER, P. Microdetermination of nitrogen in seed protein extracts. **Anal. Chem.**, v.49, 1980, p. 1977.
- FERNANDES, M. S. Absorção e metabolismo de nitrogênio em plantas. Itaguaí, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, 1978. 50p.
- FERNANDES, M. S. Effects of environmental stress on the relationship of free amino-N to fresh weight of rice plants. **Journal Plant Nutrition**. v. 14, n. 1, p.1155-1164, 1991.
- FERNANDES, M. S.; FREIRE, L. R. Efeitos de nitrogênio nítrico aplicado no solo, na atividade de nitrito-redutase e na acumulação de N-solúvel em *Brachiaria* sp. **Trurrialba**, v.26, n.3, p.268-273, 1976.
- FERNANDES, M. S.; ROSSIELLO, R. O. P. Mineral Nitrogen in Plant Physiology and Plant Nutrition. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 14, n.2, p.111-148, 1995.
- FISCK, H. J.; DANDEKAR, A. M. The introduction and expression of transgenes in plant. **Scientia Horticulturae**, v.55, p.5-36, 1993.
- FLORES, H. E. Plant roots as chemical factories. **Chem. Ind.**, v. 10, p.374-377, 1992.
- FONSECA, H. M. A. C. Some aspects of the physiology of endomycorrhizal plants with associated nitrogen fixing bacteria. PhD Thesis, University of Dundee. 1994.

- FUKUNAGA, Y.; RING, J.; CHILD, J. J. The influence of TCA-cycle acids on nitrate utilization by cultured plant cells. **Plant Sci. Lett.** v. 19, p.9-19, 1978.
- FURLANI, A. M. C.; BATAGLIA, O. C.; AZZINI, L. E. comportamento diferencial de linhagens de arroz na absorção e utilização de nitrogênio em solução nutritiva. **Revista brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 10, p.51-59, 1986.
- GAMBORG, O. L.; SHYLUK, J. The culture of the plant cells with ammonium salts as the sole nitrogen source. **Plant Physiol.**, v.45, p.598-600, 1970.
- GAMBORG, O.L. The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. **Plant Physiol.**, v.45, p.372-375, 1970.
- GAO, Z. F.; LIPS, S. H. Effects of increasing inorganic carbon supply to roots on net nitrate uptake and assimilation in tomato seedlings. **Physiologia Plantarum.** v. 101, p.206-212, 1997.
- GENTRY, L. E.; WANG, X. T.; BELOW, F. E. Nutrient uptake by wheat seedlings that differ in response to mixed nitrogen nutrition. **Journal of Plant Nutrition**, v.12, n.3, p.363-373, 1989.
- GRANICK, S. Urease distribution in plants. General Methods. **Plant. Physiol.** 12:471-486, 1987.
- GUNES, A.; INAL, A.; AKTAS, M. Reducting nitrate content of NFT grown winter onion plants (*Allium cepa* L.) by partial replacement of NO_3^- with amino acid in nutrient solution. **Scientia Horticulturae** v.65, p.203-208, 1996.
- JONES, A. Proteolyses of legumes. Crop. Science. v.35, p.537-541, 1995.
- JOUANIN, L.; BRASILEIRO, A. C. M.; LEPLÉ, J. C.; PILATE, G.; CORNU, D. Genetic transformation: a short review of methods and their applications, results and perspectives for forest trees. **Annu. Sci. For.**, v.50, p.325-336, 1993.
- KUNZ, A.; LOVATO, P. E. Colonização micorrízica e crescimento de plantas de abacaxi (*Ananas comosus* (L) Merrill) após micropropagação em meios

com diferentes concentrações de sacarose. Resumo. FertBIO-98, XXIII Reunião Bras. Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, VII Reunião Brasileira sobre Micorrizas, V Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo e II Reunião Brasileira de Biologia do Solo. Caxambu, MG. 11 a 16 de outubro de 1998, p.197, 1998.

- LACORTE, C.; MANSUR, E. Transferência de genes através da *Agrobacterium tumefaciens*: avaliação da compatibilidade patógeno-hospedeiro. **ABCP Notícias**, v.21, p.2-7, 1993.
- LAINÉ, P.; OURRY, A.; BOUCAUD, J. Shoot control of nitrate uptake rates by roots of *Brassica napus* L.: Effects of localized nitrate supply. **Planta** v.196, p.77-83, 1995.
- LAWLOR, D, W. Concepts of nutrition in relation to cellular processes and environment. In Porter, J. R.; Lawlor, D. W. eds. **Plant Growth Interactions with nutrition and environment**. Great Britain: Cambridge University Press. Society of Experimental Biology. **Seminar Series**, v.43, p. 1-26, 1991.
- LEWIS, R. J.; LOVE, S. L. Potato genotypes differ in petiole nitrate-nitrogen concentration over time. **Hort Science**, v.29, n.3, p. 175-179, 1994.
- LINDSEY, K. Plant tissue culture manual. Department of Botany, University of Leicester. U. K. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, London. Supplement 3, February. 1993.
- LU, J. L.; ERTL, J. R.; CHEN, C. M. Transcriptional regulation of nitrate reductase mRNA levels by cytokinin-abscisic acid interactions in etiolated barley leaves. **Plant Physiology**, v.98, p. 1255-1260, 1992.
- MACIEL, A. L. R.; CARVALHO, G. R.; PASQUAL, M.; SPERA, M. R. N. Influência do ácido indol butírico no enraizamento *in vitro* de explantes de *Saintpaulia ionantha* WENT. Resumo do V Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal. 16 a 20 de julho de 1995, UFLA, p. 124, 1995.
- MARTIGNONE, R. A.; GUIAMET, J. J.; NAKAYAMA, F. Nitrogen partitioning and leaf senescence in soybean as related to nitrogen supply. *Field Crops Research*. v. 17, p. 17-24, 1987.

- MATSUMOTO, H.; YASUDA, T.; KOBAYASHI, M.; TAKAHASHI, E. The inducible formation of urease in rice plants. **Soil Sci. Plant Nutr.** v.12, p.33-38, 1966.
- MATSUMOTO, T.; OKUNISHI, K.; NISHIDA, K.; NOGUCHI, M.; TAMAKI, E. Studies of culture conditions of higher plant cell in suspension culture. II. Effect of nutritional factors on growth. **Agr. Biol. Chem.**, v.35, p.543-551, 1971.
- MITCHELL, H. T. Microdetermination of nitrogen in plant tissue. **J. Ass. Off. Agric.**, v.55, p.1-3, 1972.
- MOORE, S.; STEIN, W. H. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. **J. Biol. Chem.** 211: 907-913, 1954.
- MUGNIER, J.; MOSSE, B. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in transformed root-inducing T-DNA roots grown axenically. **Phytopathology**, v.77, p.1045-1050, 1987.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant.** v. 15, p.473-497, 1962.
- OJIMA, K.; OHIRA, K. Nutritional requirements of callus and cell suspension cultures. In: Thorpe, T. A. ed., *Frontiers of plant tissue culture*. Calgary, University of Calgary, p.265-275, 1978.
- PEOPLES, M. B.; PATE, J. S.; ATKINS, C. A. Mobilization of nitrogen in fruiting plants of a cultivar of cowpea. **J. Exp. Bot.** v.34, p.562-578, 1983.
- PLADYS, D.; RIGAUD, J. Senescence in french-bean nodules: Occurrence of different proteolytic activities. **Physiol. Plant.** v.63, p.43-48, 1985.
- POLACCO, J. C. Nitrogen metabolism in soy bean tissue culture. In: *Assimilation of urea*. **Plant Physiol.** v.58, p.350-357, 1976.
- POLACCO, J. C.; HOLLAND, M. A. Roles of urease in plant cells. **Int. Rev. Cytol.** v.145, p. 65-103, 1993.

- ROSSIELLO, R. O. P.; ARAÚJO, A. P.; MANZATTO, C. V.; FERNANDES, M. S. Comparação dos métodos fotoelético e da interseção de área, comprimento e raio médio radicular. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.30, p. 633-638, 1995.
- SARGENT, P. A.; KING, J. Investigations of growth-promoting factors in conditioned soybean root cells and in the liquid medium in which they grow: ammonium, glutamine, and amino acids. **Can. J. Bot.** v.52, p.1747-1745, 1974.
- SATO, A. Y.; MARIA, J.; JUNQUEIRA, C. S.; SEDIYAMA, T.; CECON, P. Efeito da concentração de nitrato e amônio no desenvolvimento in vitro da mandioca (*Munihot esculenta*, Crantz) com e sem BAP. Resumo da FertBIO-98, XXIII Reunião Bras. Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, VII Reunião Brasileira sobre Micorrizas, V Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo e II Reunião Brasileira de Biologia do Solo. Caxambu, MG. 11 a 16 de outubro de 1998, p.736, 1998.
- SCHONTZ, D.; ROBIN, C.; GUCKERT, A. Study of the tow pathways of nitrogen nutrition in white clover (*Trifolium repens* L.): nitrogenase and nitrate reductase activities. Proceedings of the XVI International Grassland Congress, 4-11, October, 1989, Nice, France. p.491-492, 1989.
- SCHONTZ, D.; ROBIN, C.; LAURENTIE, D.; GUCKERT, A. Effects of nitrate on the growth and the fixation of nitrogen in white clover (*Trifolium repens* L.): importance of the rhizobium strain. Proceedings of XVI International Grassland Congress, v.4-11, October 1989, Nice, France. Ref.6, p. 489-490, 1989.
- SECOR, J.; SHIBLES, R.; STEWART, C. Metabolic changes in senescing soybean leaves of similar plant ontogeny. **Crop. Sci.** v.23, p. 105-110, 1983.
- SKOKUT, T. A.; FILNER, P. Slow adaptation of urease levels in tobacco cells cultured on different nitrogen sources. **Plant Physiol.** 59: 5-10, 1977.
- SOLBRITT, A.; HANS, E.; BENGT, S. Effects of liming on the uptake of organic and inorganic nitrogen by mycorrhizal (*Paxillus involutus*) and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris* plants. **New Phytol.** v. 135, p.763-771, 1996.

- SOUZA JÚNIOR, V. S.; SANTOS, P. M.; SILVA, C. S. A.; DANTAS, F. L.; LIMA JÚNIOR, M. A. Efeito de doses de nitrogênio no desenvolvimento de plantas de rabanete. Resumo. FertBIO-98, XXIII Reunião Bras. Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, VII Reunião Brasileira sobre Micorrizas, V Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo e II Reunião Brasileira de Biologia do Solo. Caxambu, MG. 11 a 16 de outubro de 1998, p.594, 1998.
- SOUZA, E. C. Plasmídios bacterianos In: COSTA, S. O. P. ed. **Genética Molecular e de Microrganismos; os fundamentos da engenharia genética**. Ed. Manole, São Paulo, 1987, 559p.
- SOUZA, S. R. Efeitos da aplicação foliar de nitrogênio pós-antes sobre as enzimas de assimilação de N e acúmulo de proteína em grãos de arroz. UFRRJ, 1995, 152p. (Tese de Doutorado).
- SOUZA, S. R.; OLIVEIRA, S. A. S.; ANDRADE, L. L. O.; STARK, E.M. L. M. Atividade da Glutamina Sintetase, Glutamato Desidrogenase e Protease em variedades de arroz cultivadas com ou sem sombreamento. Resumo. FertBIO-98, XXIII Reunião Bras. Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, VII Reunião Brasileira sobre Micorrizas, V Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo e II Reunião Brasileira de Biologia do Solo. Caxambu, MG. 11 a 16 de outubro de 1998, p.488, 1998.
- SRIVASTAVA, H. S.; FLETCHER, R. A. Triademenol treatment of canola seeds increase nitrate reductase activity and nitrate content of leaves. **J. Expt. Bot.** v.43, p.1267-1271, 1992.
- TENNANT, D. A Test of a modified line intersect method of estimating root lenght. **Journal of Ecology**, oxford, v. 63, p. 995-1001, 1975.
- TINLAND, B. The interaction of T-DNA into plant genomes. **Trends in Plant Sciences**, v. 1, p. 178-184, 1996.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. EMBRAPA / CNPH. Brasília, 1990.

- URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R. Dinâmica do N no solo. In: I Simpósio brasileiro sobre nitrogênio em plantas. UFRRJ, p. 127-167. 1993.
- VALE, F. R.; GUAZELLI, E. M. F.; FURTINI NETO, A. E.; FERNANDES, L. A. Cultivo do feijoeiro em solução nutritiva sob proporções variáveis de amônio e nitrato. **R. Bras. Ci. Solo**, v.22, p.35-42, 1998.
- Van der MEER, I. M.; EBSKAMP, M. J. M.; VISSER, R. G. F.; WEISBEEK, P. J.; SMEEKENS, S. C. M. Fructan as a new carbohydrate sink in transgenic potato plants. **Plant Cell**, v.6, n.4, p.561-70, 1994.
- VANCE, C. P.; GANTT, J. S. Control of nitrogen and carbon metabolism in root nodules. **Physiol. Plant.** v.85, p.266-274, 1992.
- VANCE, C. P.; HEICHEL, G. H.; BAMES, D. K.; BRYAN, J. W.; JOHNSON, L. E. Nitrogen fixation, nodule development, and vegetative regrowth of alfalfa (*Medicago saliva* L.) following harvest. **Plant Physiol.** v.64, p.1-8, 1979.
- VARMA, A. Arbuscular mycorrhizal fungi: state of the art. **Critical Reviews Biotechnology**, v. 15, p. 179-199, 1995.
- VARSHAVSKY, A.; BACHMAIR, A.; FINLEY, D.; GONDA, D.; WUNNING, I. The N-end rule of selective protein turnover. Mechanical aspects and functional implications. In: Ubiquitin. Rechsteiner, M. (Ed.), p.287-324, Plenum Publishing Corp., New York. 1988.
- VASIL, I. K. Molecular improvement of cereal. **Plant Molecular Biology**, v.25, p.925-937, 1994.
- WALDEN, R.; WINGENDER, R. Gene-transfer and plant-regeneration techniques. **Trends Biotech.**, v. 13, p.324-331, 1995.
- WITTENBACH, V. A.; ACKERSON, R. C.; GIAQUINTA, R. T.; HERBERT, R. R. Changes in photosynthesis, ribulose biphosphate carboxylase, proteolytic activity, and ultrastructure of soybean leaves during senescence. **Crop. Sci.** v.20, p.225-231, 1980.

CAPÍTULO II

**ESTUDO METABÓLICO DE RAÍZES TRANSGÊNICAS (*Ri T-DNA*)
DE CENOURA. (*Daucus carota* L.) E DE TREVO (*Trifolium repens* L.)
EM SIMBIOSE COM MICORRIZA ARBUSCULAR (*Glomus clarum*)
EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA**

RESUMO

Apesar dos benefícios dos fungos micorrízicos arbusculares (FMA) às plantas, a impossibilidade do cultivo desses fungos em sistema *in vitro*, limita os estudos metabólicos sobre essa simbiose e a produção de inóculos, pois o FMA só se propaga na presença de tecido vegetal metabolicamente ativo. Entretanto, com a manipulação genética é possível modificar raízes, introduzindo DNA de plasmídeo bacteriano indutor de enraizamento (*Ri T-DNA*), de maneira que as raízes se propaguem em meio de cultura, e possam ser usadas como substrato para a colonização por FMA. No entanto, pouco é conhecida a simbiose entre FMA e raízes transgênicas (RT). O objetivo deste trabalho foi avaliar o metabolismo das RT de cenoura (*Daucus carota* L.) e trevo (*Trifolium repens* L.) em dois experimentos, quando em simbiose ou não com FMA (*Glomus clarum*), em dois meios de cultivo, mínimo e MS. O delineamento experimental foi um fatorial inteiramente ao acaso, para as raízes de cenoura e de trevo. Tanto as raízes de cenoura como de trevo, apresentaram maiores teores de N-amino, N-amônio, atividade da GS, GOGAT, GDH, proteases e proteína, quando cultivadas em meio MS, com valores mais elevados no início do crescimento vegetativo. Porém, com o desenvolvimento do processo de senescência, os valores dos parâmetros de N-amino, açúcares solúveis, N-amônio e atividade da enzima GS, decresceram, paralelamente ao

aumento das enzimas GOGAT, GDH e proteases, independente do meio de cultivo ou presença do FM. Os resultados demonstraram que quando as RT apresentaram a máxima produção de biomassa (aos 49 dias do cultivo das raízes), exauriram do meio de cultivo, nutrientes e principalmente carbono, que influenciou no desencadeamento do processo de senescência (84 dias). Com o aumento da senescência (131 dias) das raízes, ocorreu uma maior degradação dos tecidos radiculares, que foi caracterizada pelo aumento das enzimas catabólicas, proteases e GDHd, que atuam na degradação das proteínas, liberando os aminoácidos (amida, glutamina), produzindo esqueletos de carbono e energia, que podem se utilizados para reincorporar o N-Reciclado, através da enzima GDHa e da GOGAT. Os resultados indicam que a via GS/GOGAT, característica dos tecidos vegetais deixa de atuar em sincronismo, sendo substituído por GDH/GOGAT em condições de estresse ou senescência, quando há excesso de amônio.

ABSTRACT

In spite of the benefits of the fungus mycorrhizal arbuscular (FMA) to plants, the impossibility of the cultivation of those fungus *in vitro*, limited the metabolic studies and the inocule production, because FMA only propagate in the presence of plant tissue active metabolically. However, with the genetic manipulation it is possible to modify the roots, introducing DNA of roots inductor bacterial plasmidium (*Ri T-DNA*), so that the roots propagate in culture media, and that can be used as substratum for FMA colonization. However, little is known on the metabolism of these roots and its symbiosis with FMA and roots transgênic (RT). The objective of this work was to evaluate in two experiments the metabolism of carrot RT (*Daucus carota* L.) and clover (*Trifolium repens* L.), when in symbiosis or not with FMA (*Glomus clarum*), in two cultivation media, minimum and MS. The experimental design was a completely randomized factorial, for both carrot and clover roots. Carrot as well as clover roots, presented higher contents of N-amino, N-ammonium, activity of GS, GOGAT, GDH, proteases and protein, when cultivated in a MS media, with higher values in the beginning of the vegetative growth. However, with the development of the senescence process, N-amino, soluble sugars, N-ammonium and the enzyme GS activity values, decreased, parallely to the increase of the enzymes GOGAT, GDH and proteases, independent of the growth media or presence of FM. The results showed that when RT presented

the maximum biomass yield (after 49 days of roots cultivation), exhausted the cultivation media, nutrients and mainly carbon, that influenced the development of the senescence process (84 days). With the increase of roots senescence (131 days) roots, it a higher degradation of the radicular tissues, was observed which was characterized by an increase of the catabolic enzymes, proteases and GDHd, that act in the degradation of the proteins, liberating the amino acids (amida, glutamina), producing skeletons of carbon and energy, that cannot been used for reincorporate N - Recycled, through the enzyme GDHa and of GOGAT. The results indicate that the GS/GOGAT path, characteristic of the vegetable tissues stops acting in synchronism, being substituted by GDH/GOGAT in stress conditions or senescence, when there is excess of ammonium.

1 - INTRODUÇÃO

As micorrizas são associações mutualísticas entre raízes e fungos que constituem uma simbiose complexa, com várias interações. Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) apenas esporulam em associação com raízes metabolicamente ativas, uma vez que, necessitam de substrato energético produzido pelo vegetal, para completar o seu ciclo de vida.

Apesar do estudo dos processos de colonização de FMA ter recebido maior impulso a partir da década de 60, o cultivo dos FMA em condições axênicas representa um grande desafio da pesquisa na área da biologia de plantas e fungos (Mugnier & Mosse, 1987; Varma, 1995). Só a partir da utilização de raízes geneticamente transformadas, foi possível um grande avanço da pesquisa nessa área, com alguns trabalhos que apresentaram respostas positivas de esporulação de FMA em RT (Bécard & Piché, 1992; Berbara, 1995).

Após terem sido superadas as dificuldades para se obter colonização e esporulação de FMA em sistemas *in vitro*, vários trabalhos têm sido desenvolvidos com o propósito de elucidar os principais fatores relacionados com essa associação simbiótica, desde a fase de pré-infecção até a esporulação

dos FMA (Bécard & Piché, 1992; Fonseca, 1994; Berbara, 1995).

É sugerido que a esporulação dos FMA é estimulada durante a senescência ou influência de estresse sofrido pelo vegetal, apesar do sinal que desencadeia o processo de esporulação micorrízica ainda ser motivo de muitas pesquisas. As hipóteses baseiam-se no fato de que durante o processo de senescência a disponibilidade de metabólitos fornecidos pela planta hospedeira ao fungo micorrízico tornam-se limitadas e diferenciadas, pois nesta fase o catabolismo toma-se intenso, visando a manutenção das atividades do vegetal, cessando o processo de simbiose. Durante esta fase, há aumento da atividade das enzimas hidrolíticas, principalmente das proteases, além da produção de compostos fenólicos e modificações no metabolismo do carbono (Huffaker & Tansley, 1990; Brzin & Kidric, 1995; Lambas, 1997; Berbara & Fonseca, 1996).

Portanto, para se entender a esporulação micorrízica, faz-se necessário não apenas estudos sobre o sistema de produção *in vitro* com o uso de raízes transformadas geneticamente, mas também devem ser avaliadas as modificações metabólicas que ocorrem neste sistema de cultivo, já que elas podem influenciar a esporulação dos FMA.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi acompanhar e avaliar o metabolismo das RT de cenoura (*Daucus carota* L.) e de trevo (*Trifolium repens* L.), nos diferentes estádios das RT associadas ou não aos FMA, desenvolvidas em diferentes meios de cultivo.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1- ASSOCIAÇÕES MICORRÍZICAS E SEU PAPEL NA NUTRIÇÃO MINERAL DE PLANTAS

2.1.1- Associações com fungos micorrízicos arbusculares (FMA)

Os fungos micorrízicos arbusculares proporcionam maior capacidade de crescimento das plantas hospedeiras, devido ao melhor suprimento de nutrientes minerais de baixa mobilidade no solo, principalmente o fósforo (P). As hifas externas do fungo, são capazes de absorver e de transportar para a planta hospedeira os nutrientes do solo além da zona de depleção da raiz (Thompson, 1986; Tinker et al., 1992).

Os FMA absorvem nutrientes como P, Zn, Cu, N, Ca, Mg, S, Mn, e K, porém, a percentagem desses nutrientes absorvidos pelos FMA é variável, dependendo da espécie vegetal e do fungo (Lambert & Weidensaul, 1991; Kothari et al., 1991; Marschner & Dell, 1994; Cliquet, et al., 1997).

A efetividade do FMA em fornecer o P para a planta hospedeira é variável com a espécie de FMA, sendo que apenas o parâmetro “colonização das raízes”, é insuficiente para avaliar essa eficiência. Deve ser levado também em consideração, o desenvolvimento e a atividade da hifa externa, a taxa de transporte na hifa e a interação do soluto na interface raiz da planta hospedeira-arbúsculos. Estudos revelam que apenas uma porção da hifa externa é ativa e essa atividade diminui à medida que a hifa se distancia da raiz hospedeira (Silvia, 1988; Bethlenfalvay & Franson, 1989; Raju et al., 1990).

Nas associações planta-FMA não ocorrem alterações morfológicas e as hifas do fungo se desenvolvem tanto no interior da raiz, na região do córtex formando os arbúsculos, como externamente, formando o micélio. Enquanto a hifa absorve da solução do solo os nutrientes minerais, nos arbúsculos, regiões de interface fungo-planta, ocorrem troca de metabólitos (Siqueira & Franco, 1988).

Apesar de apresentar um pequeno diâmetro, a hifa do FMA possui uma grande área superficial. Polifosfatos são acumulados em seus vacúolos e servem como reserva de energia e uma fonte primária de ATP. Estes polifosfatos são importantes poliânions que podem interferir no balanço de cátions e ânions dos fungos, retendo cátions como potássio e magnésio e aminoácidos básicos como glutamina e arginina. Dentro da hifa ativa, há um fluxo bidirecional de carboidratos, nutrientes minerais, polifosfato entre outros (Jennings, 1989).

2.1.2 - Absorção de N em associações micorrízicas

As plantas quando em associações com fungos micorrízicos são capazes de absorver mais nitrogênio, sendo o N transferido da solução do solo para a planta via FMA (Hatch, 1937; Read & Stribley, 1973; Paulino et al., 1994; Cliquet et al., 1997).

As hifas externas dos FMA são capazes de absorver o N da solução do solo e o transportar para a planta hospedeira, em uma proporção de 20% a 31% maior que em uma planta não micorrizada (Ames et al., 1983; George et al., 1992).

O N inorgânico pode ser absorvido através das hifas externas dos FMA, tanto na forma de NO_3^- como de NH_4^+ (Bago et al., 1996). Na literatura, existe um grande número de informações sobre uma maior eficiência na absorção e assimilação de N-NH_4^+ por plantas quando estas estão associadas aos FMA, refletindo num maior crescimento nestas plantas hospedeiras (Ames et al., 1983; Bellei & Carvalho, 1992; Marschner, 1995). Esses resultados, em geral, são provenientes de estudos realizados em regiões de clima temperado, na qual a preferência e/ou eficiência da utilização do NH_4^+ nas associações micorrízicas pode ser atribuída a maior predominância de íons NH_4^+ em relação ao NO_3^- nestes solos. No solo, o NH_4^+ não é móvel, sendo provavelmente absorvido por estas associações com mais eficiência, uma vez que, as hifas externas dos FMA aumentam a área de superfície das raízes, proporcionando conseqüentemente uma maior absorção dos nutrientes (Siqueira & Franco, 1988; Urquiaga et al., 1993; Marschner, 1995; Bago et al., 1996).

Quando o N é absorvido na forma de NO_3^- este deve ser reduzido para

que seja assimilado, o que requer um grande gasto de energia. A ação da luz nos tecidos fotossintetizantes, fornecerá através dos fotossistemas a energia necessária. Deste modo, a energia luminosa pode ser considerada um dos fatores limitantes na absorção deste íon (Marschner, 1995; Srivastava, 1995; Pimentel, 1998).

2.1.3 - Desempenho das associações micorrízicas na utilização de NO_3

Estudando a associação micorrízica nas espécies arbóreas, cinamomo (*Melia azedarach*), fedegoso (*Senna macranthera*), jacarandá mimoso (*Jacaranda mimosafolia*) e cássia verrugosa (*Senna multijuga*), utilizando-se uma mistura de FMA *Glomus etunicatum* e *Gigaspora margarita* em solução nutritiva com diferentes fontes de nitrogênio, NO_3^- , NH_4^+ e NH_4NO_3^- , Pereira et al. (1994) observaram maior crescimento vegetativo das plantas tratadas nas fontes de N nítricas, com exceção apenas para o jacarandá.

Bago et al. (1996) também observaram que o NO_3^- é absorvido por micélios extra radiculares de FMA *Glomus intraradices*.

As RT são cultivadas em meio com N na forma nítrica, mas não é conhecido o metabolismo dessas raízes nessa fonte de N. Sabe-se apenas, que as associações micorrízicas de raízes transformadas (*Ri T-DNA*) de cenoura e de trevo inoculadas com FMA, apresentaram significativas taxas de esporulação, quando essas espécies são cultivadas em Meio Mínimo - MM, cuja fonte de N é constituída apenas de NO_3^- (Bécard, & Fortin, 1988; Bécard & Piché, 1992; Berbara, 1995).

O peso seco de raízes e parte aérea de *Picea abies* associada a FM *Pisolithus tinctorius*, quando cultivadas em sistema hidropônico com fonte de N na forma de nitrato, apresentaram maior desenvolvimento em relação a testemunha, porém os valores não diferiram significativamente entre si. Quando a fonte de N foi o amônio, esses resultados foram inferiores ao da testemunha (Eltrop & Marschner, 1996).

Em raízes de trevo colonizadas por FMA, foi observado uma maior atividade da enzima NR, quando as plantas foram cultivadas em meio com nitrato. Foi sugerido que esta resposta ocorreu em virtude a uma melhor nutrição fosfatada, uma vez que esses fungos são capazes de absorver mais este nutriente (Oliver et al., 1983).

2.1.4 - Desempenho das associações micorrízicas na utilização de NH_4^+

As associações micorrízicas absorvem N preferencialmente na forma amoniacal. As hifas dos fungos são capazes de absorver NH_4^+ em baixa concentração quando comparado com as raízes não colonizadas pelo fungo (Karunaratne et al., 1987; Siqueira & Franco, 1988). Foi também observado que o desenvolvimento de hifas externas de *Glomus intraradices* é favorecido pela adição de NH_4^+ ao solo (Johansen et al., 1994).

O N na forma de NH_4^+ pode ser tóxico para o cultivo de tecido vegetal *in vitro*, e portanto, não deve ser fornecida como única fonte de N em meio de cultura, mas segundo Torres & Caldas (1990), pode contribuir com até um terço do total de N fornecido ao vegetal.

Coxwell & Johnson (1985), determinaram em plantas micorrizadas, como melhor relação de fontes de N, a que apresentava 75% de NO_3^- e 25% de NH_4^+ , com esta proporção as plantas micorrizadas apresentaram o dobro do conteúdo de aminoácidos, do que as plantas não micorrizadas.

Os FMA podem absorver N tanto através da via GS/GOGAT como GDH. A via GS/GOGAT é mais importante quando os níveis de NH_4^+ são baixos. Em níveis elevados predomina a GDH, provavelmente, devido ao elevado K_M desta enzima pelo substrato (Plassard et al., 1986; St. John et al., 1985; Karunaratne et al., 1987). A assimilação de amônia pela via GS/GOGAT foi citada também em associações de milho com o *Glomus fasciculatum* e em *Allium cepa* com *Glomus mosseae* (Smith et al., 1985).

Em hifas de FMA *Glomus intraradices*, a concentração de aminoácidos decresceu em 30% quando foram submetidas a uma substância inibidora de GOGAT, mais conhecida por “Albizzine”, indicando deste modo, que as hifas do *Glomus intraradices* possuem o sistema enzimático GS/GOGAT, para assimilar o N inorgânico na forma de NH_4^+ . Foi observado em fungos ectomicorrízicos basidiomicetos, que a assimilação de N também ocorre através da via GS/GOGAT (Kershaw & Stewart, 1992; Chalot et al., 1994; Johansen et al., 1996).

Quoreshi et al. (1995), observaram que no metabolismo do N em fungos ectomicorrizas, a GDH-NADPH foi predominante na assimilação do amônio, em relação a atividade detectada para a GDH-NADH e GS. O nível de atividade da enzima GDH-NADPH foi de aproximadamente 50 vezes ao da enzima GS durante o período exponencial do crescimento de ectomicorriza. A atividade das enzimas GS e GDH-NADPH foi maior quando o N foi suprido na

forma de NO_3^- e para a enzima GDH-NADH, foi maior em NH_4^+ .

2.1.5 - Associações de leguminosas com fungos micorrízicos

As leguminosas, através de seu grande potencial de fixar o N_2 atmosférico quando em associações com bactérias, contribuem para o aumento do N nas associações micorrízicas.

O crescimento de leguminosas inoculadas com FMA em solos com baixo P, pode aumentar a nodulação, fixação de N_2 e crescimento da planta hospedeira, devido a uma maior exploração de superfície de solo pelas hifas dos fungos (Brown et al., 1988).

As hifas externas dos FMA podem funcionar como uma ponte entre plantas, fazendo transferência de nutrientes, até mesmo entre espécies diferentes. Tal transferência é possível também para o N, entre leguminosas e não leguminosas, como foi observado entre a soja e o milho (Hamel & Smith, 1992).

2.1.6 - Associações com ectomicorrizas

A nutrição mineral da planta hospedeira de fungos ectomicorrízicos possui semelhança com as associações de FMA. Entretanto, há algumas diferenças em termos de arranjo de estrutura fúngica na raízes e mecanismo de aquisição de nutrientes (Siqueira & Franco, 1988; Bellei & Carvalho, 1992).

Morfológicamente, as ectomicorrizas apresentam estrutura fúngica constituída de micélio, manta fúngica e a rede de Hartig. O micélio circundante tem função de transportar água e nutrientes da solução do solo para a planta hospedeira. A manta fúngica, constitui o local de armazenamento e a rede de Hartig, região de trocas entre os simbioss, que inclui a interface fungo-hospedeiro. Entretanto, há vários tipos de ectomicorrizas e estas podem apresentar características morfológicas distintas (Harley, 1969; Bellei & Carvalho, 1992).

Em associações de plantas com ectomicorrizas até 90% da zona apical da raiz pode ser coberta pela manta fúngica (Marschner, 1995).

Dos fotossintatos, a sacarose, é citada como a principal forma de carbono requerida pelo fungo ectomicorrízico. A sacarose translocada é hidrolisada em glicose e frutose, que rapidamente se convertem em substâncias de reserva (trialose, manitol e glicogênio) para o fungo. Estes carboidratos não são diretamente utilizáveis pela planta. O dreno a partir da fonte de produção é mantida, uma vez que as substâncias de reserva são consumidas pelo fungo, que em consequência, estimula a translocação de sacarose para a raiz, o que por sua vez, por feed back irá estimular a fotossíntese (Harley & Smith, 1983; Bellei & Carvalho, 1992).

O micélio circundante, apresenta uma grande variação em sua espessura, e é ele que torna a ectomicorriza mais eficiente na absorção de nutrientes, particularmente quando estes se encontram em níveis limitados ou quando são relativamente imóveis na solução do solo, como os íons, Cu^{2+} , Zn^{2+} , SO_4^{2-} e NH_4^+ , que são absorvidos em maior proporção devido as hifas (Agerer, 1987; Bellei & Carvalho, 1992).

2.2 - USO DE MICORRÍZAS E DIFICULDADES PARA A PRODUÇÃO DE INÓCULO DE FMA

2.2.1 - Uso de micorrizas

O uso de fungos micorrízicos, seja ele obtido através de inoculação ou de ocorrência natural, pode resultar em benefícios nutricionais para a planta hospedeira. A melhora no estado nutricional, pode permitir maior adaptação ao ecossistema, aumentando a capacidade de sobrevivência e crescimento inicial de mudas transplantadas. Pode também ser observado uma redução de perdas provocadas por fatores bióticos como pragas e doenças, resultando em uma maior produtividade em solos pobres, além de uma maior tolerância da planta ao estresse abiótico (Siqueira & Franco, 1988; Newsham et al., 1995; Varma, 1995).

O Brasil possui uma grande área de solos extremamente lixiviados, ácidos e distróficos, como os solos de cerrado. Do ponto de vista sócio-econômico essas regiões possuem pouca infra-estrutura, com produtividade agrícola limitada pelo baixo nível de insumos utilizados (Sieverding & Saif, 1984; Marschner, 1995). Essa limitação pode ser superada com o emprego de tecnologias de baixo custo, como a utilização de inóculo de fungos micorrízicos, a exemplo da utilização de inoculação com *Rhizobium* na cultura da soja. Os FMA possuem um grande potencial, principalmente em solos pobres e com déficit hídrico e há também um grande número de culturas com elevada dependência micorrízica (Siqueira et al., 1994).

Os FMA interferem no controle do ciclo do carbono da planta

hospedeira, como um importante dreno desse elemento da atmosfera (Harley & Smith, 1983; Vogt et al., 1991), e contribuem como importante agente agregante com ação física e biológica, ajudando na estruturação de comunidades vegetais (Gogala, 1991; Jastrow & Miller, 1991; Francis & Read, 1994; Tidsdall, 1994). Portanto, é justificada a procura dos mecanismos envolvidos na simbiose com FMA, com o objetivo prático de aumentar a produção de plantas em solos marginais, reduzir o uso de fertilizantes químicos e contribuir para uma agricultura sustentável e menos dependente de insumos.

2.2.2 - Dificuldades para a produção de inóculo de FMA

A tecnologia para a produção de inoculantes está bastante desenvolvida para fungos ectomicorrízicos, existindo várias patentes de produção nos EUA e países da Europa, mas está pouco desenvolvida para os FMA. A falta de inoculante de aceitação comercial e de um padrão oficial para seu controle de qualidade, constituem os principais obstáculos para o uso dos FMA (Siqueira e Franco, 1988).

A produção de esporos e de outros propágulos que constituem o inóculo, tem sido um grande obstáculo, pois devido ao seu caráter biotrófico, os FMA só esporulam em associação com a planta hospedeira.

Até o presente momento, inóculos de FMA são produzidos de maneira artesanal, com o uso de planta multiplicadora em substrato. No entanto, vários outros métodos vem sendo propostos, entre eles os sistemas hidropônico e aeropônico; e mais recentemente, a utilização de raízes transformadas

geneticamente (raízes transgênicas) (Fonseca, 1994; Berbara, 1995; Souza et al., 1996).

No sistema hidropônico, a produção do inóculo apresenta algumas desvantagens, devido a concentração de N e P da solução nutritiva e principalmente pela aeração no sistema (Howeler et al., 1982; Menge, 1984; Mosse & Thompson, 1984). Já no sistema aeropônico, a produção pode ser de 5.082 e 156.336 esporos de *Entrophospora colombiana* g.⁻¹ de matéria seca de raízes de batata doce em períodos de 70 e 89 dias da inoculação, respectivamente (Souza et al., 1996b).

Com o desenvolvimento de raízes transgênicas, que são raízes destacadas cultivadas *in vitro*, foi possível a esporulação dos FMA em um sistema onde ocorre maior controle de qualidade do inóculo. A partir de um único propágulo de FMA pode ser produzido milhares de esporos (Fonseca, 1994; Berbara, 1995).

2.3 - USO DE RAÍZES TRANSGÊNICAS

2.3.1- Raízes transgênicas e sua associação com os FMA

Raízes transgênicas são utilizadas para os estudos de associações micorrízicas devido os FMA serem simbiontes obrigatórios. Este método permite a associação entre fungo e raízes metabolicamente ativas, além de apresentar um fácil manuseio *in vitro*. Estas raízes são desenvolvidas na

ausência de promotores de crescimento. Sendo cultivadas por um longo período de tempo, apresentam estabilidade das características fenotípicas e genotípicas dos simbiontes envolvidos; além de ser um sistema de cultivo controlado, permite o estudo fisiológico de RT colonizadas por FMA, em especial do metabolismo do N.

As raízes transgênicas transformadas com o vetor *Agrobacterium rhizogenes* (Ri T-DNA) podem ser cultivadas em sistema *in vitro* por longos períodos, o que possibilita a associação com FMA e o estudo desta simbiose (Fonseca, 1994; Berbara, 1995).

O cultivo destas raízes é possível com o fornecimento ao meio de cultura de uma fonte de carbono (como sacarose) ou na presença de um fluxo contínuo de CO_2 e luz incidente, o que possibilita a obtenção de raízes fotossinteticamente ativas ou fotoautótrofas (“raízes verdes”) (Flores et al., 1993; Berbara & Fonseca, 1996).

As raízes verdes podem ser indicadas para o estudo do metabolismo do carbono em associações micorrízicas. Estas raízes apresentam cloroplastos em suas células corticais, desenvolvidas pela exposição à luz. Em seus processos metabólicos o CO_2 (do ambiente atmosférico simulado) é fixado em células corticais onde os níveis de clorofila e Ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase-oxidase (RUBISCO) são semelhantes aos encontrados em folhas de plantas não transgênicas (Flores et al., 1993).

O sistema com RT apresenta a vantagem de manter as características fenotípicas e genotípicas dos organismos envolvidos, possibilitando assim, o controle dos mecanismos bioquímicos e fisiológico envolvidos nos processos de colonização e de esporulação dos FMA, por permitir o acompanhamento

dos estádios de desenvolvimento dos simbiontes de maneira não destrutiva.

A taxa de esporulação de FMA em RT aumenta com o tempo de colonização (Fonseca, 1994). Tal fato pode estar relacionada com algum tipo de estresse ou senescência das raízes transgênicas. Estes dados indicam que a esporulação é controlada pelo hospedeiro, provavelmente através de modificações no metabolismo do carbono e / ou em seu balanço hormonal ou enzimático (Berbara & Fonseca, 1996).

2.4 - METABOLISMO DE N EM RAÍZES MICORRIZADAS

Alguns trabalhos relatam que mudanças consideráveis no metabolismo de N nos simbiontes podem ocorrer com o desenvolvimento de ectomicorrizas, influenciadas tanto pela espécie de fungo como pela espécie de planta hospedeira. O desenvolvimento e a atividade metabólica dos simbiontes, pode alterar a biossíntese e distribuição de enzimas envolvidas no metabolismo de N (Martin et al., 1992; Martin & Botton, 1993; Botton & Chalot, 1995).

Em fungos ectomicorrízicos, o N é absorvido da solução do solo tanto na forma de nitrato como de amônio, através das hifas do fungo. A assimilação do amônio ou do nitrato reduzido, é iniciada nas células extra matricial e também na manta fúngica quando então é incorporada em glutamina e glutamato, através da GS e GDH, respectivamente. A glutamina é transportada através da manta fúngica e rede de Hartig, quando então a enzima GOGAT pode torna-se a mais importante na produção de aspartato e asparagina pela via GS/GOGAT (Chalot et al., 1991; Martin et al., 1992).

A enzima GDH, parece ter um papel pouco significativo na assimilação de amônio em fungos ectomicorrízicos, exceto em elevada concentração de amônio, em que essa enzima é acionada, devido ao seu elevado K_M (Martin et al., 1992).

Fungos micorrízicos são capazes de utilizar proteínas solúveis e aminoácidos como fonte de N (Abuzinadah & Reid, 1986). A glutamina é a forma de N mais encontrada nos fungos ectomicorrízicos, e a arginina e a citrulina, nos FMA formados (Cooper, 1984; Genetet et al., 1984).

Em hifas externas de *Glomus intraradices* em simbiose com a *Cucumis sativa* L., foi encontrado no pool de aminoácidos livres glutamina, glutamato, aspartato e alanina, correspondendo a 91-94% do total, embora os valores de omitina, serina e glicina tenham sido baixas. Asparagina foi o aminoácido dominante, constituindo 70% do pool de aminoácidos livres, independente da fonte de N ser nitrato ou amônio. Segundo Johansen et al. (1996), isto indica que glutamina e glutamato tem um papel chave na entrada de N em compostos orgânicos e como precursores de outros aminoácidos.

2.5 - METABOLISMO DE N EM ASSOCIAÇÕES DE RAÍZES TRANSGÊNICAS (*Ri T-DNA*)

As raízes transformadas *Ri T-DNA* de diferentes dicotiledoneas podem ser cultivadas em meios com apenas NO_3^- , alguns aminoácidos e vitaminas, como Glicina, Tiamina, Piridoxina, Ácido Nicotínico e Mio inositol, além de sacarose e os outros nutrientes essenciais ao metabolismo normal do tecido

vegetal (Bécard & Fortin, 1988; Fonseca, 1994; Berbara, 1995).

Desenvolvidas em placas de Petri, contendo meio de cultivo e seladas com parafilme ou algum tipo de filme plástico e cultivadas por um longo período de tempo, as raízes transformadas *Ri T-DNA* são capazes de absorver praticamente todos os nutrientes do meio. Neste sistema de cultivo, quando as raízes entram em senescência elas dispõem apenas do N-Reciclado para a sua sobrevivência, principalmente, porque o N do meio de cultivo é todo consumido. Durante a senescência, a deaminação dos aminoácidos, o catabolismo de proteínas e a biossíntese de lignina, produzem N na forma de amônio, que nestas condições, pode ser incorporado aos tecidos radiculares através das vias, GDH e GS / GOGAT (Srivastava & Singh, 1987; Hageman & Bellow, 1990; Chalot et al., 1994; Johansen et al., 1996).

2.6 - COMPARAÇÃO DO METABOLISMO DE N EM RAÍZES MICORRIZADAS E NÃO MICORRIZADAS

A absorção de N pelas raízes micorrizadas ou não pode ser tanto na forma de NH_4^+ como de NO_3^- . Raízes de plantas hospedeiras e fungos ectomicorrízicos, preferem absorver o N na forma de NH_4^+ , provavelmente, por ser uma forma de N já reduzida. Em fungos ectomicorrízicos, não há muita capacidade de reserva de NO_3^- . Algumas espécies são capazes de reduzir o NO_3^- eficientemente, em ordem similar a magnitude de plantas superiores. (Plassard et al., 1991).

As raízes são estruturas não fotossintéticas e como a redução de NO_3^-

requer um grande consumo de energia, as RT utilizam energia proveniente da oxidação de açúcares absorvidos do meio. Entretanto, a concentração de açúcares solúveis em raízes, pode ser muito baixa em algumas espécies vegetais durante todo o ciclo de cultivo (Souza et al., 1996a).

Os fungos ectomicorrízicos, são capazes de assimilar N em suas estruturas fúngicas, através das enzimas GS e GDH. A atividade da enzima GOGAT é acionada a partir da região de interface, fungo-planta. A atividade da enzima GDH, apresenta características semelhantes em tecidos radiculares e fúngicos, quanto à questão do seu elevado K_M , que requer elevada concentração de NH_4^+ para o seu funcionamento (Chalot et al., 1991; Martin et al., 1992).

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - MEIOS PARA O DESENVOLVIMENTO DAS RAÍZES TRANSGÊNICAS

A partir dos resultados obtidos em estudo das RT em diferentes meios com N nas formas orgânicas e inorgânicas, foi possível definir os seguintes meios de cultura para a realização dos outros experimentos: MS (Murashige & Skoog) e mínimo (Bécard & Piché, 1992) (Tabela 1).

Os meios escolhidos para o desenvolvimento das RT, são utilizados freqüentemente no sistema *in vitro*. O meio mínimo (com apenas NO_3^- como fonte de N) que possui 38,59 mg N/L já vem sendo utilizado para o cultivo dessas raízes (Fonseca, 1994; Berbara, 1995) e o meio com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$, (meio MS, com 551,75 mg N/L na forma de NO_3^- e 288,75 mg N /L na forma de NH_4^+ é freqüentemente utilizado em culturas de tecidos vegetais (Maciel et al., 1995; Zanette et al., 1995, Kunz & Lovato, 1998).

Tabela 1 - Concentrações e proporções de cada fonte de N nos meios.

Meios*	NO_3^- (mg N/litro)	NH_4^+ (mg N/litro)	Proporção $\text{NO}_3:\text{NH}_4^+$
Mínimo	38,59	-	100 : 0
MS	551,75	288,75	66 : 34

*MM - Mínimo, com N-NO_3^-

MS - Murashige & Skoog, com $\text{N-NO}_3^- + \text{NH}_4^+$

A concentração de solidificante (Gel-gro) dos meios de cultivo foi reduzida de 5.000 mg/L para 4.000 mg/L, com o objetivo de facilitar a retirada das raízes para compor as amostras. No momento da coleta, as placas foram vertidas em uma peneira e as raízes retiradas do meio com o auxílio de jatos de água.

O delineamento estatístico utilizado foi em blocos inteiramente ao acaso, sendo os tratamentos arranjados em um fatorial 2 X 2 X 3 (dois meios, presença ou ausência do *Glomus clarum* e três coletas), com três repetições, sendo cada uma constituída de 6 placas de Petri, tanto para as raízes de cenoura como de trevo.

Os meios com as diferentes fontes de N na forma inorgânica foram preparados e vertidos em placas de Petri (20 cm de diâmetro) descartável com capacidade de 55 ml de meio, seladas com parafilme e estocadas até o momento da repicagem das raízes transgênicas. Três segmentos de 3 cm de raízes transgênicas de cenoura (*Daucus carota* L.) ou trevo (*Triflium repens* L.), foram repicados em cada placa com os diferentes meios, seladas com parafilme e estocadas em câmara termostática com temperatura constante de

22°C na ausência de luz.

3.2 - PREPARO DOS ESPOROS DO *Glomus clarum*

O inóculo de *G. clarum* foi obtido de potes de multiplicação com solo como substrato, sendo os esporos extraídos através do método de decantação e peneiramento como descrito por Gerdemann & Nicolson (1963). Com a eliminação dos detritos orgânicos e inorgânicos, o material foi centrifugado em uma solução de sacarose de 50% (v/v), por 2 minutos em 1500 rpm. O sobrenadante foi coletado em uma peneira com 106 mm de abertura e 140 mesh de malha., lavados em água corrente e selecionados com o auxílio de uma lupa, para posterior desinfestação, como descreve a metodologia de Bécard & Fortin (1988), com algumas modificações.

Em uma câmara de fluxo laminar e sobre um vidro de relógio próximo de uma chama de lamparina, os propágulos foram cobertos por uma solução de Tween-20 na concentração de 0.05 % (v/v), por 1 minuto, com a finalidade de reduzir a tensão superficial. Uma solução de cloramina-T 2% (p/v) foi filtrada em filtro Millipore com abertura de 0.22 μm , por um período de 15 minutos. A solução foi retirada com o auxílio de pipeta Pasteur até o nível dos esporos, quando colocou-se uma mistura de antibióticos constituída de Estreptomicina 200 mg/L e Gentamicina 100 mg/L, por um período de 50 minutos, sendo essa solução de antibiótico trocada cinco vezes. Os esporos foram colocados em frascos de vidro estéril com a solução de antibiótico já citada e incubados por um período de 15 dias.

Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, os esporos foram colocados em placas de Petri que já continha os meios de cultura, as placas foram acondicionadas à temperatura ambiente para germinar.

Após um período de aproximadamente 15 dias, os esporos viáveis germinaram e foram inoculados (2 esporos por placa) nas raízes de cenoura e trevo que já estavam em desenvolvimento nos meios mínimo ou MS. Em seguida, as placas foram seladas com parafilme e estocadas no escuro em câmara termostática com temperatura constante de 22°C, o experimento de cenoura foi mantido em uma câmara e o de trevo em outra, até as datas de coletas.

As datas das coletas foram realizadas em função do ciclo de crescimento das raízes e da simbiose com o FMA:

Coleta 1 - As RT apresentavam-se em pleno vigor (49 dias após repicagem das raízes e 21 dias da inoculação do fungo);

Coleta 2 - No início da senescência das raízes (84 dias após repicagem das raízes e 56 dias da inoculação do fungo);

Coleta 3 - Quando as raízes apresentavam-se em avançada senescência (132 dias após repicagem das raízes e 111 dias da inoculação do fungo).

3.3 - MONITORAMENTO DA SIMBIOSE DE RAÍZES TRANSGÊNICAS DE CENOURA E DE TREVO COM *Glomus clarum*, EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.

As raízes de cenoura e de trevo, desenvolvidas em placas de Petri sob

diferentes tratamentos, foram observadas microscopicamente e filmadas, durante o processo de colonização e esporulação dos FMA.

O peso fresco, extração alcoólica, N-amino livre, açúcares solúveis, N-nitrato, N-amônio, proteases e proteína foram determinados de acordo com o item 3 do capítulo I.

3.4 - ANÁLISE DAS ENZIMAS

3.4.1- Extração das enzimas

As raízes de cenoura e de trevo foram cortadas em pedaços de aproximadamente 2 cm, pesado 1g, colocadas em almofariz, com um volume de nitrogênio líquido capaz de cobri-las, foram então maceradas com um pistilo. Em seguida, foi acrescentado o tampão de extração, homogeneizado, filtrado em gaze e passado para os tubos de centrífuga, colocados sobre gelo. Os tubos com as amostras foram centrifugados e em seguida o sobrenadante foi recolhido (em tubos sobre gelo) e iniciada as análises das enzimas de assimilação do N.

3.4.2 - ATIVIDADE DA NITRATO REDUTASE - NRA

Para a determinação da atividade da NR, 200 mg de raízes frescas foram colocadas em tubo de ensaio, onde se acrescentou 5 ml de solução incubadora

contendo n-propanol 2%, **KNO₃** 0,02 M* e tampão fosfato 0,1 M pH 7.5. Os tubos foram cobertos com papel alumínio e incubados em banho-maria a 30°C por 30 minutos. **ON₃⁻** foi utilizado no meio de incubação para se medir a “atividade potencial”.

Após a incubação retirou-se para o ensaio 0.4 ml da amostra, acrescentado-se 0.3 ml de sulfanilamida 1%, 0.3 ml de n-naftil-etileno-diamino 0.02% e deixando-se em repouso por 20 minutos. Em seguida foi adicionado 4 ml de água destilada, homogeneizado-se e realizou-se a leitura em 540 nm contra curva padrão de **NaNO₃**. Os resultados foram expressos em nmoles de **NO₂** / g de peso fresco/ hora (Jawroski, 1971).

3.4.3 - Atividade da Glutamina Sintetase - GS

Para a extração da enzima, 1g de raízes foi macerado em **N₂** líquido por 3 minutos (segundo metodologia de Farnden & Robertson, 1980). Devido as raízes serem tenras, não foi necessário triturá-las. Em seguida acrescentou-se 8 ml do tampão de extração (Tris-HCl 0.1M pH 7.8, **MgSO₄** 1M e Mercaptoetanol) e homogeneizou-se a mistura . Em seguida o material foi passado por gaze, recolhendo-se o filtrado em tubos de centrifuga dentro do gelo. Centrifugou-se logo em seguida por 15 minutos a 0°C a 15.000 g, quando então o sobrenadante foi recolhido e conservado em gelo.

Para a reação, foram utilizados tubos de aproximadamente 10 ml contendo: 0,2 ml de tampão Imidazol - HCl 0,5 M pH 7,5; 0,1 ml de solução de Mercaptoetanol 0,1 M ou Dithiothreitol 0.1 M; 0,1 ml de solução de **MgSO₄**

0,4 M; 0,1 ml de Hidroxilamina 0,1 M pH 6,5*; 0,1 ml de ATP 0,1 M; 0,1 ml de glutamato 0,5 M pH 7,5*; 0,3 ml da amostra e 1,0 ml de H_2O .

Todas as amostras foram deixadas em banho-maria a 30°C por 30 minutos, e a reação foi paralisada pelo acréscimo de 1.5 ml de solução com FeCl_3 . A leitura foi efetuada em 540 nm, utilizando-se como padrão gama-glutamil mono-hidroxamato. O controle foi realizado sem o acréscimo de ATP.

3.4.4 - Atividade da Glutamato Sintase - GOGAT

A atividade da GOGAT foi determinada conforme metodologias de Boland & Benny (1977); Matoh et al. (1980) e Puranik & Srivastava (1990). Em tubo de ensaio contendo TRIS-HCl 1M pH 7,8, glutamina 75mM, alfa-cetoglutarato 75 mM, foi adicionado uma amostra do extrato do vegetal e o NADH 1 mM, para iniciar a reação. Todos os tubos das amostras foram deixados em banho-maria com 35°C por 10 minutos e a leitura realizada em D.O. de 340 nm. Para as amostras controle, foi retirado o alfa-cetoglutarato e acrescentada água destilada para completar o volume de 3 ml.

3.4.5 - Atividade da Glutamato Desidrogenase - GDH

As análises da enzima GDH aminação e desaminação, foram realizadas segundo metodologia descrita por Cammaerts & Jacobs (1985).

3.4.5.1- Atividade da GDH aminação - GDHa

Em tubo de ensaio contendo Tampão de Incubação TRIS-HCL 1M pH 8,0, alfa-cetoglutarato 0,33M e **NH₄Cl** 3M, foi acrescentada uma alíquota da amostra a ser analisada e NADH 1mM. O tubo foi deixado em banho-maria a 35°C. A quantidade de NADH consumida foi determinada após 10 minutos, em 340 nm. A reação foi iniciada pela adição do NADH e as amostras controle não continham o **NH₄Cl**.

3.4.5.2 - Atividade da GDH - desaminação - GDHd

À uma alíquota do extrato das raízes foi acrescentada uma mistura de Tampão de Incubação TRIS-HCl 1M pH 9,4, glutamato 0,6 M e CaCl₂ 10 mM. Para iniciar a reação foi acrescentado em seguida 1 mM **NAD⁺**. A quantidade de **NAD⁺** consumida foi determinada após 10 minutos, em leitura realizada em D.O. 340 nm. O controle não continha glutamato.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - MONITORAMENTO MICROSCÓPICO DA SIMBIOSE ENTRE AS RAÍZES TRANSGÊNICAS DE CENOURA E DE TREVO COM *GLOMUS CLARUM*, EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

No sistema de cultivo utilizado foi possível visualizar algumas características morfológicas e fisiológicas da ontogenia da simbiose entre RT de cenoura e de trevo com o fungo micorrízico arbuscular (FMA) *G. clarum*, no meio mínimo e MS.

4.1.1 - Características das raízes

Com o decorrer do cultivo, o desenvolvimento das raízes de cenoura e de trevo, nos dois meios foi exuberante e intenso, como o observado no capítulo I. Tendo sido possível observar: no início do ciclo do desenvolvimento das raízes, os pêlos absorventes; algumas células da epiderme, na fase de

alongamento das raízes, o acúmulo de exsudatos nos ápices radiculares e na fase de senescência a descamação das células ao longo do comprimento das raízes e a oxidação generalizada desse tecido, com o tempo de cultivo.

As RT de cenoura, apresentam geotropismo negativo e diâmetro superior as raízes de trevo, que são de espessura mais fina e de geotropismo positivo. Entretanto, essas características se confundem com o desenvolvimento das raízes nos diferentes tratamentos.

4.1.2 - Características da simbiose entre RT e o FMA *Glomus clarum*

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o metabolismo das RT, cultivadas em meio mínimo e MS, em simbiose ou não com FMA, porém, não se quantificou a colonização das raízes ou o crescimento de hifas, apenas se monitorou microscopicamente a simbiose.

A germinação do esporo ocorreu com aproximadamente 15 dias de incubação, a partir da ponta da hifa de sustentação do esporo, independentemente do seu tamanho (Fotos 1 e 2). De 3 a 4 dias após o início da germinação, o esporo apresentou um número variável de hifas jovens que cresceram vigorosamente sobre o meio e entre as raízes, quando nas porções medianas destas hifas jovens foram observadas dilatações, seguidas de formação de estruturas arredondadas e ovóides, que conforme observado por Souza & Berbara (1997), culminam com a formação de esporos. Microscopicamente, não foi observada, a influência das fontes de N ou das espécies de raízes no comportamento descrito (Fotos 3 e 4).

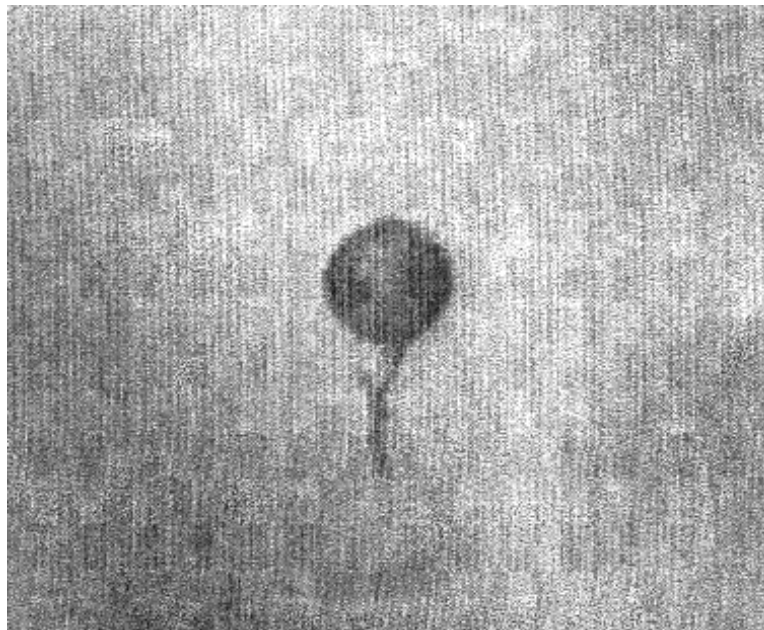


Foto 1. Esporo do FMA *Glomus clarum*.

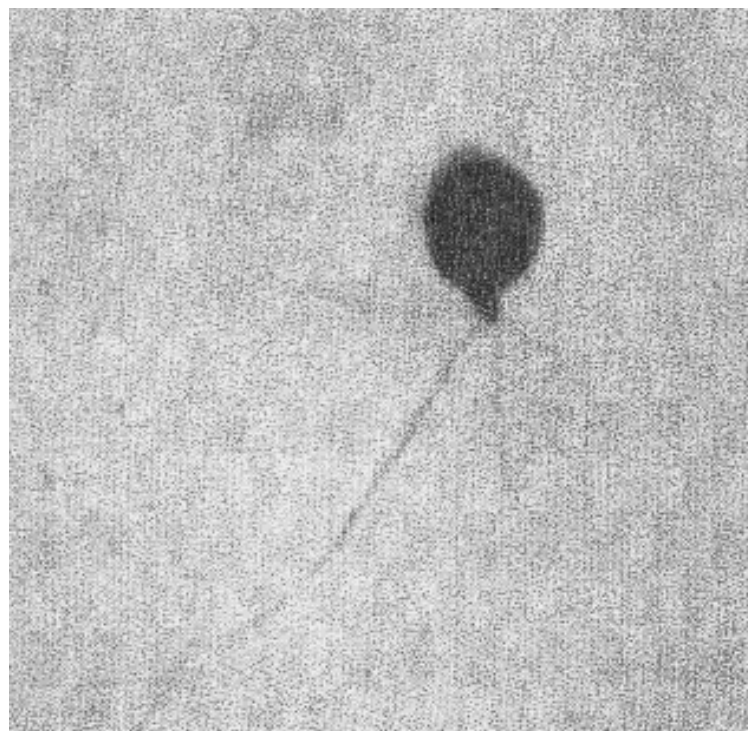


Foto 2. Esporo germinado do FMA *Glomus clarum*.

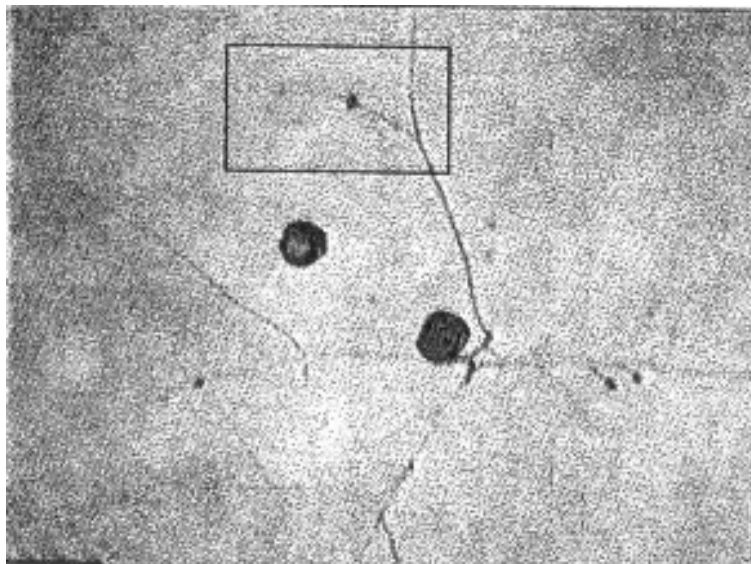


Foto 3. Aparecimento de vesículas nas hifas do FMA *Glomus clarum* em RT cultivadas em meio mínimo ou MS.

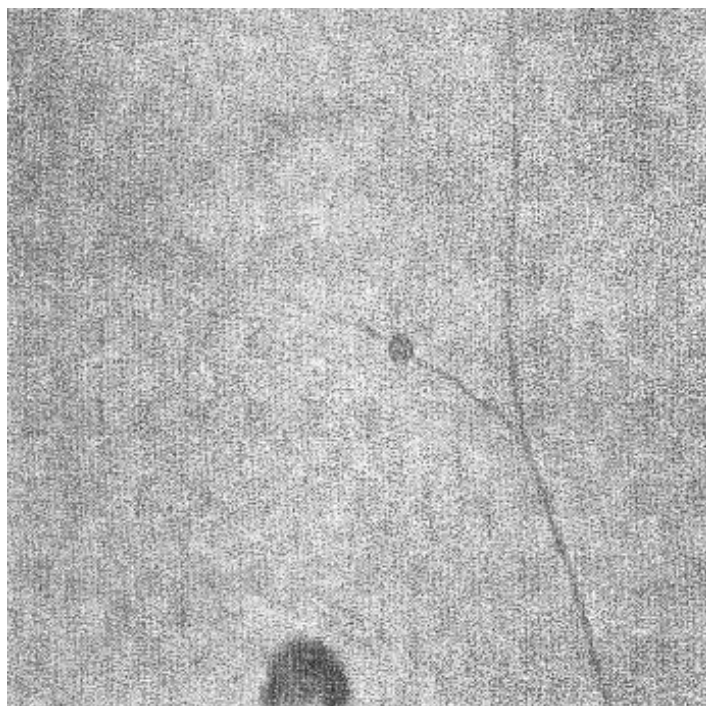


Foto 4. Detalhe ampliado da foto 3 de uma vesícula do *Glomus clarum* em RT cultivadas em meio mínimo ou MS.

O período de tempo para o aparecimento de estruturas arredondadas na espécie *Glomus clarum*, é praticamente o mesmo do desenvolvimento de células auxiliares no FMA *Gigaspora margarita*. Tal fato, foi constatado em ensaios preliminares, onde se acompanhou todo o processo de simbiose dos fungos micorrízicos *G. margarita* e *E. gregaria* em RT de cenoura e de trevo, em meio mínimo onde NO_3^- era a fonte de N e o teor de sacarose era de 5 g/L. Foi observado que o desenvolvimento de células auxiliares ocorre com aproximadamente 35 dias da germinação dos esporos.

Os pontos de infecção foram observados em praticamente todas as placas avaliadas e a esporulação dessas duas espécies de fungos, nas duas espécies de raízes, foi acelerada no período em que essas estruturas vegetais encontravam-se em processo de senescência (80 dias da inoculação dos esporos) (Foto 5).

Apesar de neste experimento não ter sido quantificada a simbiose, provavelmente ela pode ter sido maior no meio com NO_3^- , pois resultados de Bécard & Fortin (1988), em estudos com RT em diferentes meios de cultivo e NO_3^- como fonte de N, constataram que quando o meio com apenas NO_3^- foi utilizado, houve maior taxa de colonização micorrízica. Da mesma forma, Quoreshi et al. (1995), observaram um maior volume de micélio de ectomicorrizas em meio com NO_3^- , do que quando NH_4^+ como fonte de nitrogênio.

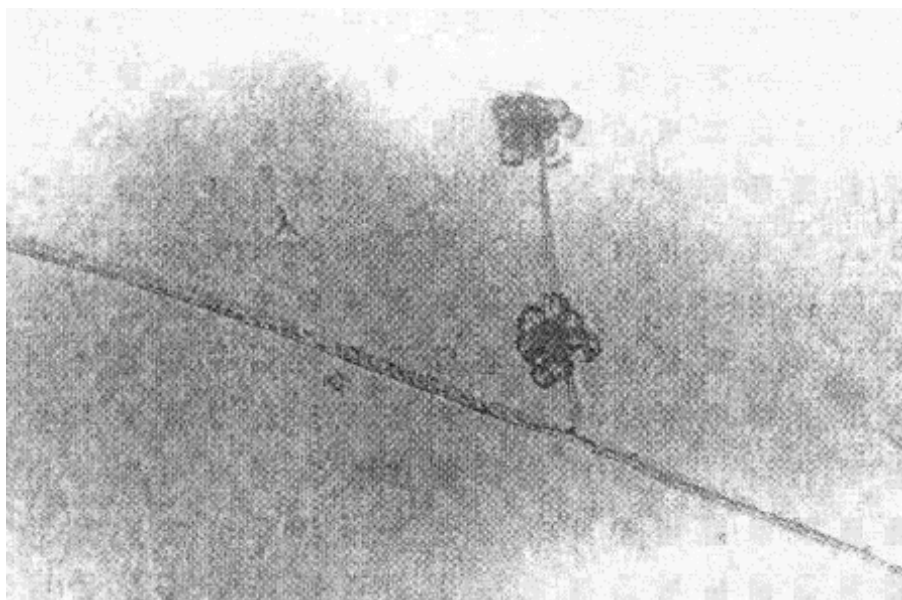


Foto 5. Células auxiliares do FMA *G. margarita*, desenvolvidas em associação com raízes transgênicas, em meio mínimo.

4.2 - PESO FRESCO DAS RAÍZES

Nas três coletas, as RT tanto de cenoura como de trevo, apresentaram maior peso fresco no meio mínimo. Houve diferença significativa de peso fresco com os tratamentos, apenas para as raízes de cenoura. O maior peso fresco das raízes de cenoura, ocorreu para os tratamentos também em meio mínimo (Figura 1).

Em geral, o peso fresco das raízes de trevo cultivadas no meio MS apresentou uma tendência de redução durante o cultivo, (Figura 1). Isto pode estar relacionado ao teor de sacarose fornecida neste meio, que normalmente é de 30g/L, mas que foi reduzida para 5g/L. Enquanto que no meio mínimo o usual é de 10g de sacarose/L, e neste caso também foi reduzida para 5g/L.

Como o meio MS é composto de maior teor de N tanto na forma de NO_3^- como de NH_4^+ , a demanda energética para a assimilação deste N é maior, com isso é necessário um maior fornecimento de energia (sacarose), que poderia ser desviada para a assimilação deste N, em detrimento do crescimento, o que pode justificar o menor peso fresco das raízes obtido nestas condições (Figura 1). Segundo Kunz & Lovato (1998), a redução da sacarose do meio MS inibiu significativamente o ganho de peso fresco das mudas de abacaxi micropropagadas.

Magalhães & Huber (1989a) também observaram menor peso fresco em raízes de tomate e de milho em cultivo com NH_4^+ , em comparação com NO_3^- . Estes autores atribuem a inibição do crescimento das espécies vegetais no meio com NH_4^+ a redução do pH da solução, ocasionada pela extrusão de prótons decorrente da absorção do NH_4^+ . Neste estudo, foi observado que o efeito

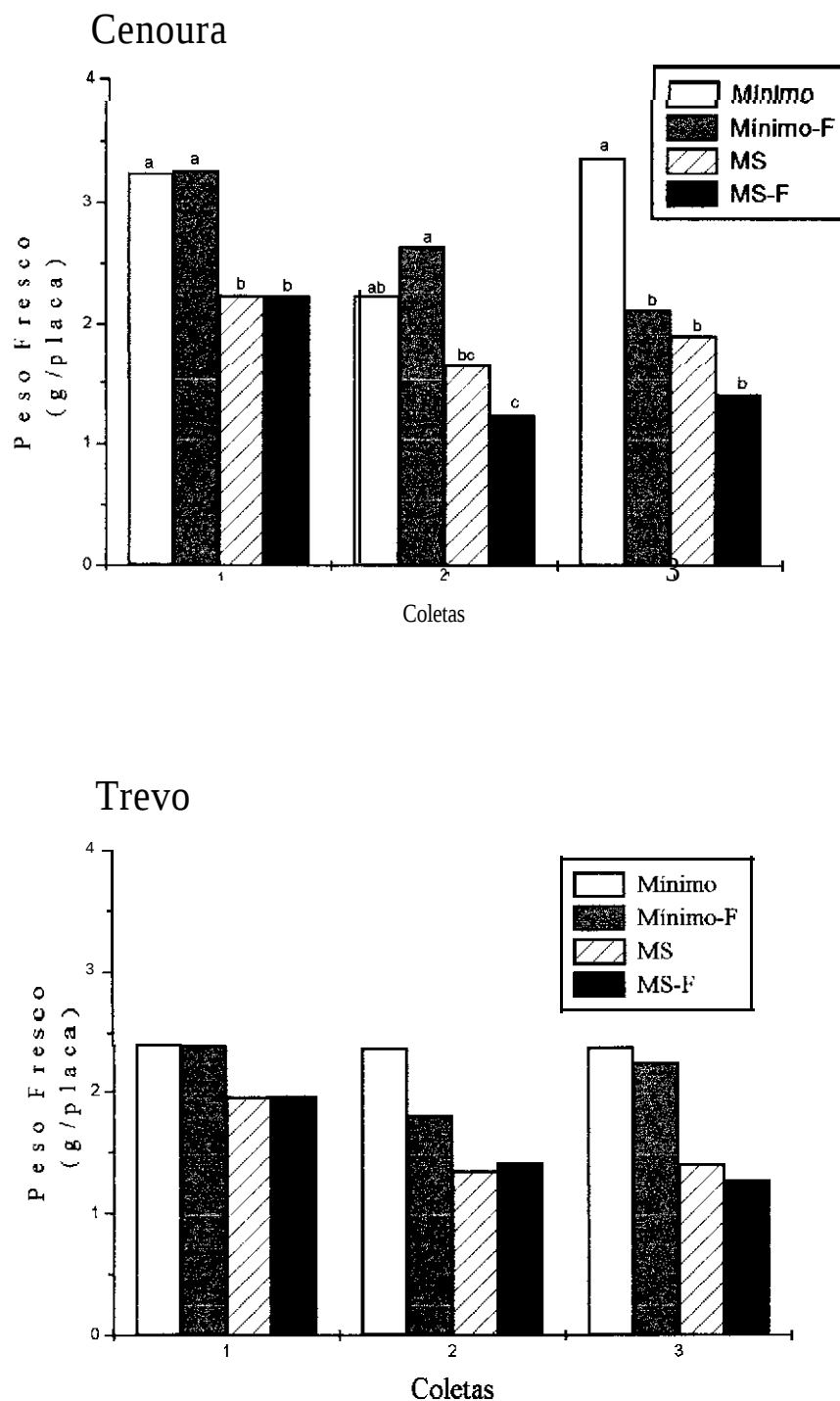


Figura 1: Peso fresco (g/placa) de raízes transgênicas de cenoura e trevo desenvolvidas em meio mínimo ou MS, com ou sem fungo micorrízico.

Coletas 1, 2 e 3 aos 49/21; 84/56 e 132/104 dias de repicagem de raiz/inoculação de fungo. Letras iguais dentro da mesma coleta, não diferem significativamente entre si (Teste Tukey, $p < 0,05$).

tóxico da absorção do NH_4^+ foi reduzido, com a manutenção do pH do meio em 5,7. Entretanto, nos meios de cultivo para as RT de cenoura e trevo tiveram seu pH ajustado para 5,8, porém, após a repicagem das raízes não foi efetuada nenhuma leitura de pH, para se determinar a possível influência do metabolismo das raízes e/ou FMA no pH dos meios, pois normalmente a absorção de NH_4^+ acidifica o meio, enquanto que para o NO_3^- ocorre o contrário (Reisenauer, 1978; Faquin, 1994). Em outros trabalhos, seria interessante o acompanhamento do pH do meio de cultura em que as RT estão em desenvolvimento.

A proporção das fontes de N do meio MS é de 66:34, $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$, respectivamente, que também pode ter limitado o crescimento das raízes. Em experimentos realizados com diferentes proporções de NO_3^- e NH_4^+ houve respostas variadas, de acordo com a espécie vegetal. Para o trigo a melhor proporção foi a de 50:50 (Gentry et al., 1989). Enquanto, que para o espinafre melhor proporção foi a de 100:0 (Zornoza & Gonzáles, 1998). Por outro lado, em plantas de arroz, que são mais tolerantes a presença de íon NH_4^+ em baixo pH, quando a relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ foi menor que 4, houve redução do crescimento das raízes (Furlani et al., 1986).

Na primeira coleta, não houve efeito da presença do fungo micorrízico no peso fresco das raízes de cenoura e de trevo, devido provavelmente ainda não haver uma simbiose estabelecida. Nas coletas 2 e 3 no meio MS a inoculação do fungo nas raízes de cenoura contribuiu para o menor peso fresco, sendo significativa apenas na coleta 3 (Figura 1). Quando não ocorre uma simbiose entre o FMA e a planta, a colonização do fungo pode refletir na redução do peso da planta hospedeira (Brown et al., 1988).

Nas condições do experimento, a simbiose entre o *G. clarum* e as RT influenciou o acúmulo de biomassa radicular da cenoura, apenas na coleta 3, reduzindo do peso fresco das raízes no meio mínimo na presença de fungo (Figura 1). A simbiose micorrízica, entre o vegetal e o FMA, é influenciada tanto por características genéticas dos dois simbioses envolvidos, como por fatores externos, como o teor de sacarose, concentrações e fontes de N do meio de cultivo (Siqueira et al., 1994).

4.3 - TEOR DE N-AMINO LIVRE

O teor de N-amino livre nas raízes de cenoura, apresentou diferença significativa entre as três coletas. Os valores médios nas coletas 1, 2 e 3 foram respectivamente 53,0; 10,0 e 1,9 $\mu\text{mol/g}$ pf. Entre os tratamentos, também houve diferença significativa de acordo com a fonte de N (Figura 2 e anexo).

Na coleta 1, o maior teor de N-amino para as raízes de cenoura, ocorreu no tratamento em que se utilizou o meio MS, independente da presença do *Glomus clarum*. Nesta coleta (aos 21 dias da inoculação), não foi detectada influência do FMA no acúmulo de N-amino livre, talvez devido a baixa colonização nesse estágio de desenvolvimento das raízes.

Na coleta 2, ocorreram diferenças significativas entre os quatro tratamentos. O tratamento que apresentou maior teor de N-amino foi o com o meio MS na ausência do fungo e o menor teor ocorreu no tratamento com meio mínimo e fungo. Na coleta 3, as raízes de cenoura com o MS na ausência do fungo, apresentaram maior teor de N-amino livre. Os demais tratamentos não

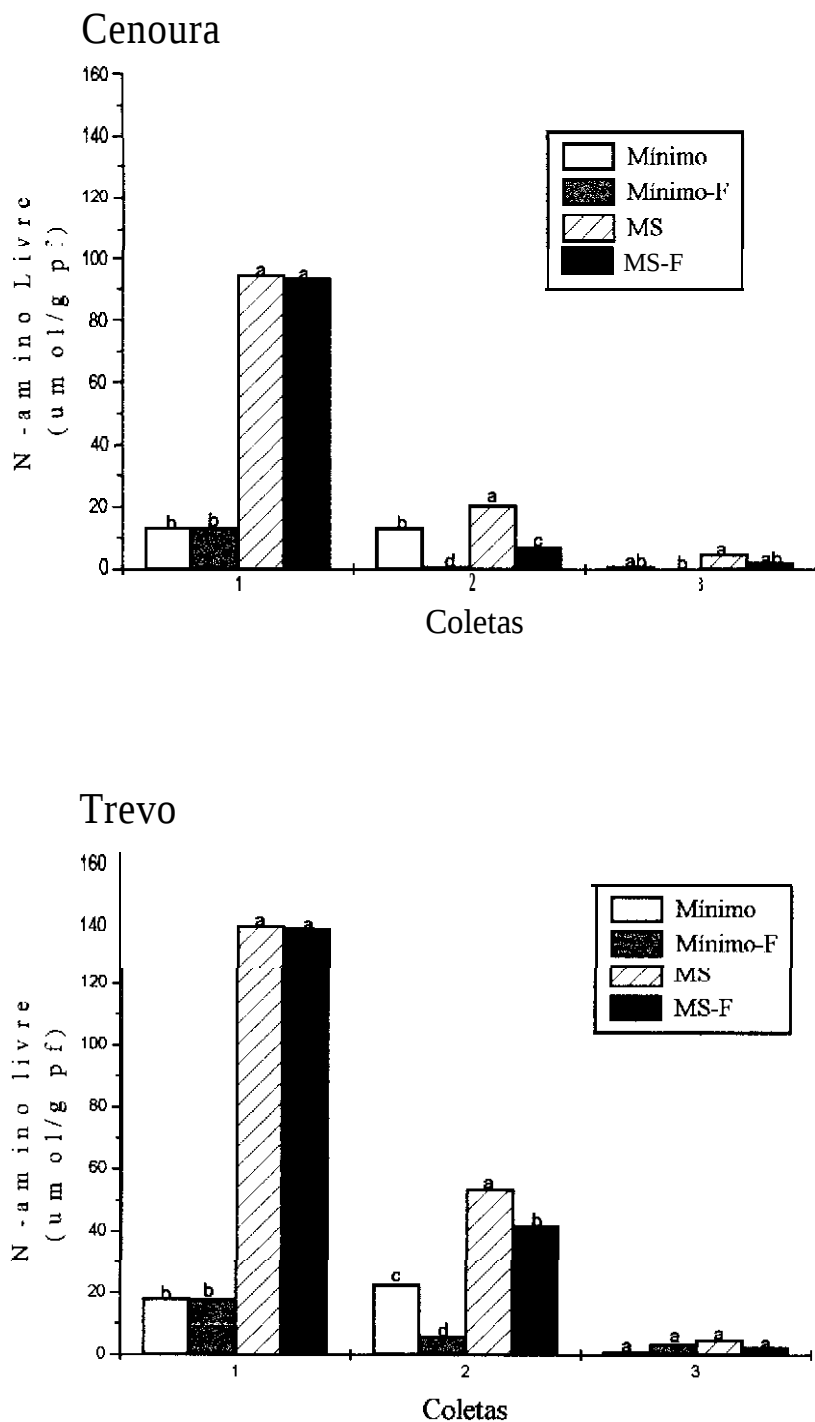


Figura 2: Teor de N-amino livre (umol/g pf) em raízes transgênicas de cenoura e trevo desenvolvidas em meio Mínimo ou MS, com ou sem fungo micorrízico. Coletas 1, 2 e 3 aos 49/21; 84/56 e 132/104 dias de repicagem de raiz/inoculação de fungo. Letras iguais dentro da mesma coleta, não diferem significativamente entre si (Teste Tukey, $p < 0,05$).

foram estatisticamente diferentes entre si (Figura 2).

O maior acúmulo de N-amino livre nas RT de cenoura e de trevo no meio MS, pode ser atribuído a maior concentração de N nesse meio, que foi 22 vezes superior a do meio mínimo, além da maior redução de sacarose que também foi superior. O acúmulo de N-amino livre nos tecidos pode indicar problemas na síntese ou aumento na degradação de proteínas (Fernandes, 1978).

Como as RT não são fotossintetizantes, pode ter ocorrido limitação de esqueletos de carbono, para a síntese de proteínas. Para evitar a toxidez pela absorção de NH_4^+ , a planta acumulou o N na forma de N-amino. Em arroz, observou-se que maior acúmulo de N-amino ocorreu em resposta a maior dose de N fornecido as plantas (Souza, 1995). Deste modo, uma maior quantidade de N-NH_4^+ foi incorporada a esqueletos de carbono para formar os aminoácidos livres. Segundo Fernandes (1991), o acúmulo de aminoácidos livres pode ocorrer em condições de excesso de absorção de nitrogênio.

O teor de N-amino nas raízes de trevo variou entre as três coletas. A partir da coleta 1, ocorreu uma queda progressiva e significativa, dos valores de N-amino nos quatro tratamentos (Figura 2). A coleta 1, apresentou maior teor, com média de $78,00 \mu\text{mol/g pf.}$, enquanto que, na coleta 3, houve menor teor de N-amino, com média de $2,00 \mu\text{mol/g pf.}$

Como pode ser observado na Figura 2, os maiores teores de N-amino foram obtidos nos tratamentos do meio MS, de modo expressivo na coleta 1 e decrescendo nas coletas 2 e 3. As raízes de cenoura e de trevo, apresentaram comportamento semelhantes durante as três coletas. De um modo geral, as raízes de trevo apresentaram um maior teor de aminoácidos livres que as raízes

de cenoura, nos quatro tratamentos e nas três coletas.

O FMA influenciou na redução dos teores de aminoácidos livres na coleta 2 nas duas fontes de N, tanto para as raízes de cenoura como de trevo. Provavelmente, neste estágio de crescimento das raízes a colonização micorrízica foi mais expressiva e os FMA tenham consumido N-amino livre, pois segundo Abuzinadah & Reid (1986), os FMA são capazes de utilizar aminoácidos livres como fonte de N.

4.4 - Teores de Açúcares Solúveis

Os teores de açúcares solúveis nas RT foram drasticamente reduzidos a partir da primeira coleta, com maior intensidade para as raízes de cenoura. Na coleta 1, quando as raízes de cenoura foram cultivadas em meio mínimo, os teores de açúcares solúveis foram significativamente maiores, com média de 63,70 mg/g pf., em relação ao meio MS. Nas coletas 2 e 3, os teores de açúcares solúveis não diferiram significativamente entre si (Figura 3).

Entre os tratamentos, os teores de açúcares solúveis nas raízes de cenoura, foram significativamente diferentes com as fontes de N, independentemente da presença do *G. clarum*. Na coleta 1, os tratamentos com nitrato, apresentaram teores de açúcares solúveis duas vezes maiores que os encontrados nos tratamentos com meio MS (Figura 3).

Na coleta 1, o trevo apresentou comportamento contrário ao das raízes de cenoura, enquanto os maiores teores de açúcares solúveis das RT de cenoura ocorreram em meio mínimo, para as de trevo ocorreram maiores

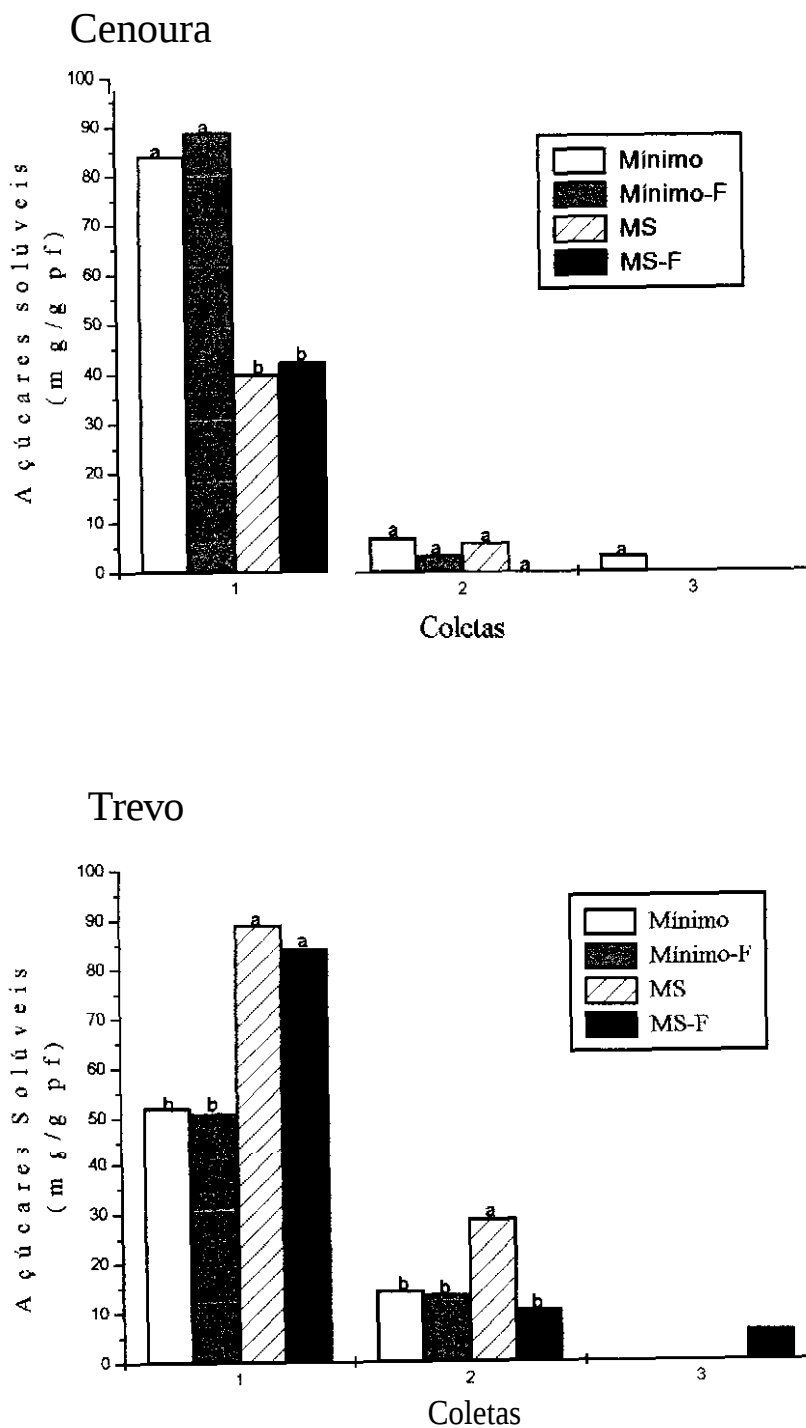


Figura 3: Teor de açúcares solúveis (mg/g pf) em raízes transgênicas de cenoura e trevo desenvolvidas em meio Mínimo ou MS, com ou sem fungo micorrízico.

Coletas 1, 2 e 3 aos 49/21; 84/56 e 132/104 dias de repicagem de raiz/inoculação de fungo. Letras iguais dentro da mesma coleta não diferem significativamente entre si (Teste Tukey, $p < 0,05$).

teores em meio MS (Figura 3).

Para o trevo, o maior teor de açúcar solúvel ocorreu na coleta 1 e o menor na coleta 3. Entre os tratamentos, o que apresentou maior teor de açúcar foi o meio MS. A inoculação do FMA nas RT influenciou apenas na coleta 2, quando houve uma redução nos teores de açúcares solúveis das raízes de trevo cultivadas em meio MS (Figura 3).

O *G. clarum* em simbiose com RT ou não, pode utilizar para seu metabolismo uma parte dos açúcares sintetizados pelo hospedeiro. Na simbiose micorrízica, a planta oferece os produtos fotossintéticos (açúcares), para o fungo e este em troca, aumenta a absorção de nutrientes para a planta (Siqueira et al., 1994). Como durante o processo de senescência há consumo da sacarose dos meios de cultivos, os eventuais decréscimos dos teores de açúcares observados durante o cultivo das RT, podem significar que as raízes e o *G. clarum* utilizaram para obterem energia metabólica durante o período de senescência (Figura 3).

As RT cultivadas em meio mínimo apresentam uma maior relação açúcares solúveis/N-amino livre do que quando cultivadas em meio MS. Com exceção do trevo no meio MS, que apresentou valores elevados tanto de açúcares quanto de N-amino (Figura 2 e 3).

Os teores de açúcares solúveis nas RT de cenoura e de trevo, foram diferentes nas 3 coletas. Para as raízes de cenoura, o maior teor ocorreu em meio mínimo. Enquanto, que nas raízes de trevo, o maior teor foi obtido em meio MS, demonstrando que há um metabolismo diferenciado entre as duas espécies (Figura 3). Diferenças nos teores de açúcares solúveis de acordo com a fonte de N, já foram observadas tanto entre espécies, quanto entre cultivares

da mesma espécie (Souza et al., 1996a; Zornoza & Gonzáles, 1998).

4.5 - Teor de N - Nitrato

Nas raízes de cenoura, houve acúmulo de nitrato apenas nas coletas 2 e 3. O nitrato só foi acumulado nos tratamentos que receberam apenas o NO_3^- como fonte de N, apesar do meio MS apresentar maior concentração de N-NO_3^- do que o meio mínimo, independente da presença do *G. clarum*. As raízes de cenoura não acumularam o N-nitrato, quando foram cultivadas em meio MS (Figura 4).

As raízes de trevo, apresentaram acúmulo significativo de nitrato apenas na coleta 1, para os tratamentos com meio MS o que deve estar relacionado com a maior concentração de N na forma de NO_3^- neste meio de cultivo (Figura 4).

Em outros trabalhos observou-se também que o aumento nos níveis de fertilizantes nitrogenados conduz a um aumento nos teores de nitrato (Chessin & Hicks, 1987; Bosh et al., 1991; Rybistskaya, 1991).

Para as raízes de cenoura não houve acúmulo de nitrato na coleta 1, provavelmente devido ao teor de açúcares solúveis neste período ter sido suficiente para reduzir esse N. Nas coletas 2 e 3, o acúmulo de nitrato nessas raízes foi detectado apenas no meio mínimo, quando os teores de açúcares solúveis eram menores (Figura 3 e 4).

O acúmulo de nitrato nas raízes de trevo, foi diferente do observado nas

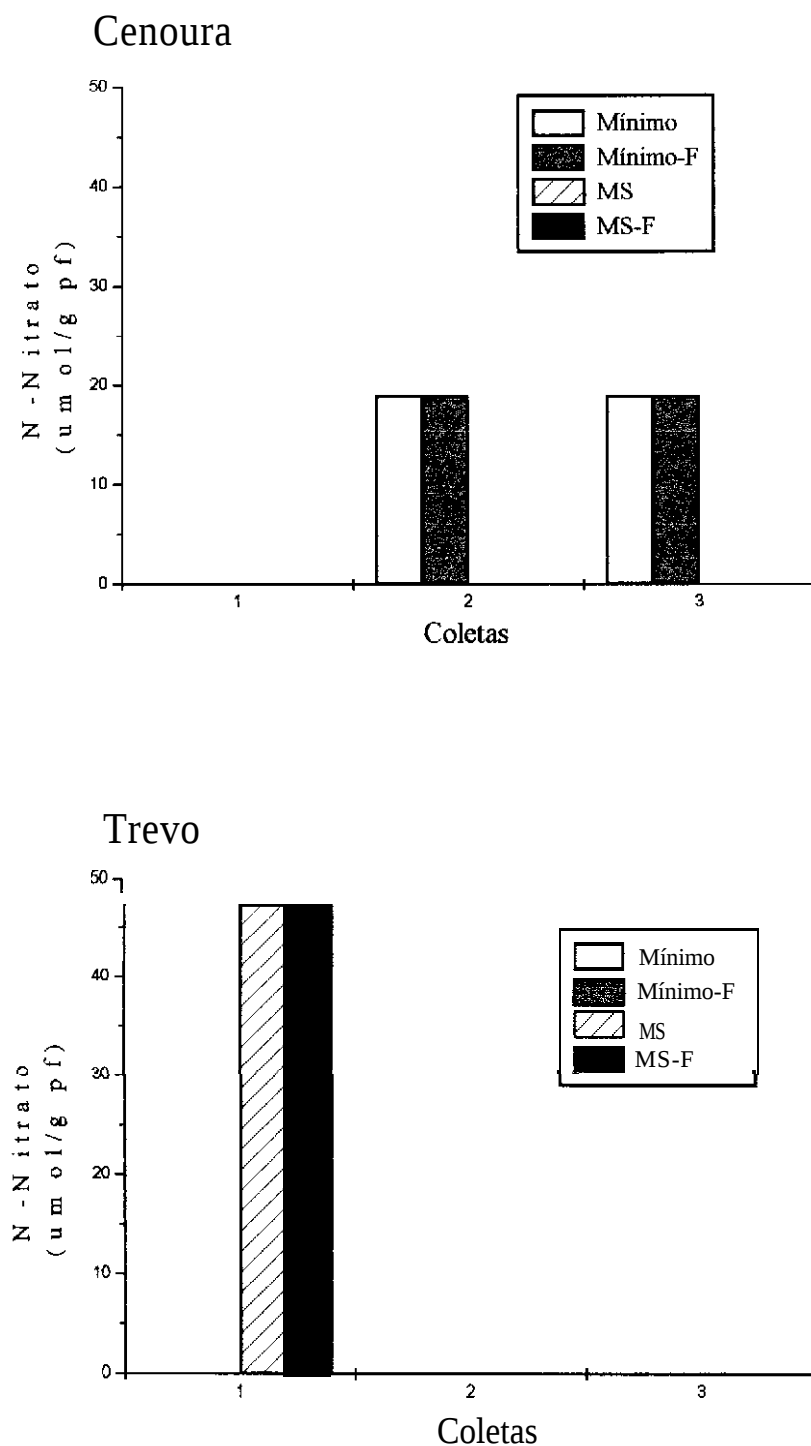


Figura 4: Teor de N-nitrato (umol/g pf) em raízes transgênicas de cenoura e trevo desenvolvidas em meio Mínimo ou MS, com ou sem fungo micorrizico. Coletas 1, 2 e 3 aos 49/21; 84/56 e 132/104 dias de repicagem de raiz/inoculação de fungo. Letras iguais dentro da mesma coleta, não diferem significativamente entre si (Teste Tukey, $p < 0,05$).

raízes de cenoura, pois apesar do trevo ter apresentado maior teor de açúcares solúveis no meio MS (Figura 3 e 4), esses açúcares parecem não ter sido suficientes para a redução do nitrato e esse N tenha sido acumulado nos vacúolos (Fernandes, 1983; Srivastava & Fletcher, 1992). Esse acúmulo de NO_3^- pode ser atribuído a concentração de N, que foi 22 vezes maior no meio MS, do que no meio mínimo. Zago (1997) também observou acúmulo de nitrato em couve quanto maior a dose de N fornecido. As espécies vegetais apresentam comportamento diferenciado.

4.6 - Teor de N - Amônio

O acúmulo de N-amônio nas raízes de cenoura foi significativamente diferente entre as coletas e os tratamentos. Na coleta 1, as RT cultivadas em meio MS apresentaram maior acúmulo de N-amônio. O FMA em geral não influenciou o acúmulo de N-amônio nos dois meios. Na coleta 2, o FMA reduziu o acúmulo de N-amônio no tratamento com o meio MS (Figura 5).

Nas raízes de trevo, o teor de N-amônio foi, significativamente, diferente entre as três coletas, decrescendo da primeira até a terceira. Comportamento semelhante foi observado para as raízes de cenoura. O N-amônio acumulou mais no tratamento que continha o meio MS (Figura 5).

Na coleta 1, o acúmulo de N-amônio nas raízes de trevo cultivadas em MS foi de aproximadamente $9 \mu\text{mol}$ N-amônio/g pf. Por outro lado, as raízes cultivadas em meio mínimo, apresentaram em média $0,5 \mu\text{mol/g}$ pf. O N-amônio na coleta 2 foi a metade do apresentado na coleta 1, quando as raízes

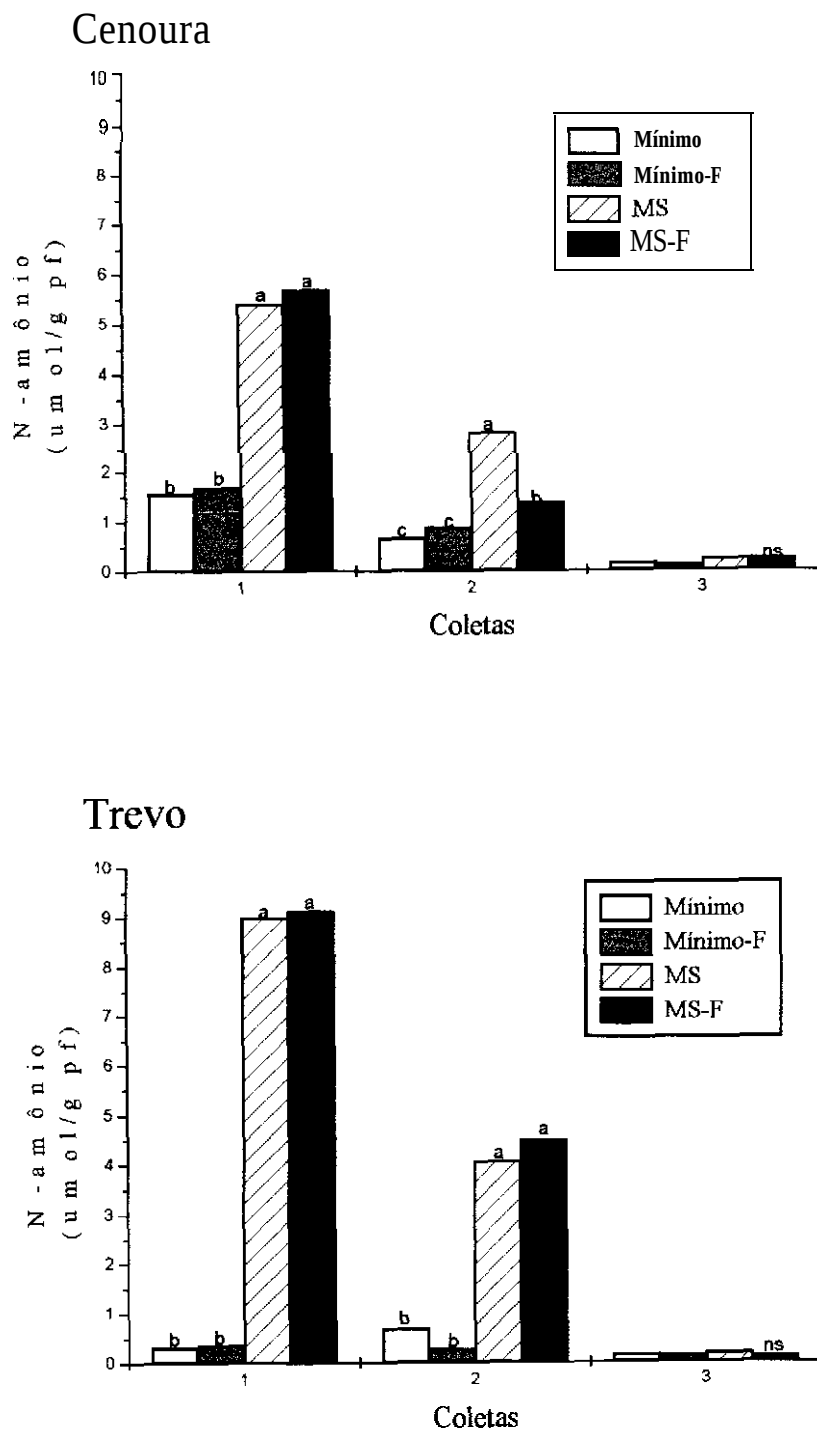


Figura 5: Teor de N-amônio (umol/g pf) em raízes transgênicas de cenoura e trevo desenvolvidas em meio Mínimo ou MS, com ou sem fungo micorrízico. Coletas 1, 2 e 3 aos 49/21; 84/56 e 132/104 dias de repicagem de raiz/inoculação de fungo. Letras iguais dentro da mesma coleta, não diferem significativamente entre si (Teste Tukey, $p < 0,05$).

foram cultivadas com MS, mas quando estas raízes foram cultivadas mínimo, este acúmulo foi semelhante ao da coleta 1. Na coleta 3, o acúmulo de N-amônio nas raízes de trevo, foi o mais baixo observado entre as coletas e não diferiu significativamente entre os quatro tratamentos (Figura 5).

Como o meio MS continha muito mais N do que o meio com apenas o NO_3^- , houve possivelmente, uma limitação de esqueleto de carbono para a incorporação do N, o que se refletiu no maior acúmulo de N-amônio.

Apesar do maior teor de N no meio $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$, isto não se refletiu em maior peso fresco nestas raízes, sugerindo que o N estava sendo acumulado como N-amino, como foi observado nas raízes de cenoura e de trevo (com maior intensidade para as raízes de trevo) (Figura 1 e 2). Tal fato, decorre provavelmente do N- NH_4^+ ser tóxico e o N nessas condições (meio com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$) ser acumulado em maior proporção. Para as raízes de trevo, o metabolismo parece ser diferente, já que os teores de açúcares também são elevados (Figura 3 e 5).

Magalhães & Huber (1989) encontraram em raízes de arroz e tomate, acúmulo de N- NH_4^+ que variou entre 0,2 e 19 $\mu\text{moles/g pf}$. Os dados para as RT encontram-se nesta faixa.

O *G. clarum* inoculado nas raízes de cenoura, contribuiu para a redução do N-amônio na coleta 2, no meio MS absorvendo o NH_4^+ . Segundo Plassard et al. (1991), raízes de plantas hospedeiras e fungos ectomicorrízicos, preferem absorver o N na forma de NH_4^+ . Em micélio de ectomicorrizas foi observado que o conteúdo de N-amônio foi reduzido, quando cultivado em NH_4^+ como fonte de N (Lorillou et al., 1996).

O acúmulo de N-amônio nas RT de cenoura e de trevo decresceu ao

longo do ciclo de cultivo. Houve maior acúmulo quando as raízes foram cultivadas com meio MS. Nestas fontes de N, as raízes de trevo acumularam mais N-amônio que as raízes de cenoura. O *G. clarum* só proporcionou diminuição significativa de N-amônio nas raízes de cenoura na coleta 2 (Figura 5).

4.7 - ENZIMAS

4.7.1 - Atividade da Nitrato Redutase - NR

As raízes transgênicas de cenoura e de trevo, cultivadas nos dois meios, não foi detectado atividade da enzima NR na coleta 1 (aos 49 dias do cultivo) e nas coletas 2 e 3, esta enzima não foi dosada.

Segundo Majerowicz (1997), as raízes não transgênicas de plantas de *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae) cultivadas *in vitro*, com sacarose a 20 g/L, apresentaram maior atividade da NR do que os encontrados nos eixos caulinares. A presença do NH_4^+ (razão $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ 2:3) teve um efeito inibitório acentuado sobre a atividade da NR, sendo esta redução equivalente tanto nas raízes quanto nos eixos caulinares. Para as RT provavelmente, a concentração de sacarose de 5 g/L nos meios de cultivo tenha influenciado na disponibilidade de carbono para a redução do N-NO_3^- (Fernandes & Freire, 1976; Ojima & Ohira, 1978).

Segundo Kramer & Boyer, (1995) o acúmulo de amônio pode reduzir a atividade da NR. Na primeira coleta, quando foi dosada essa enzima, houve

maior teor de N-NH_4^+ (Figura 5), tanto para as raízes de cenoura como de trevo, independente da fonte de N e associação com o *G. clarum*.

4.7.2 - Atividade da Glutamina Sintetase - GS

A atividade da GS foi observada somente na primeira coleta, quando as raízes estavam na fase ascendente de crescimento. Para a cenoura e o trevo o comportamento foi semelhante, com maior atividade da GS no meio MS. O FMA influenciou no aumento da atividade da GS apenas na cenoura, no meio $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$. Como o meio MS continha maior teor de N do que o meio mínimo, é justificada a maior atividade da GS, nestas condições, principalmente pelo elevado teor de N-reduzido (NH_4^+) (Figura 6).

Em cultura de couve, independente da fonte de N, a atividade da enzima GS também aumentou em resposta a quantidade de N utilizada (Pago, 1997). E em raízes de tomate, arroz e milho, a atividade da GS foi maior quando as plantas foram cultivadas em meio MS do que com no mínimo (Magalhães & Huber, 1989a).

A maior atividade da GS na coleta 1 para o tratamento com MS pode ser responsável pelo maior acúmulo de N-amino livre que foi observado tanto para cenoura como o trevo (Figuras 2 e 6).

A não detecção de atividade da GS nas coletas 2 e 3 (Figura 6) pode estar relacionada a limitação de energia metabólica para o processo (Mifflin & Lea, 1977) pelo estágio de senescência das raízes (Feller, 1990; Kamachi et al., 1992; Higashi et al., 1996). Pois, além dos meios nutritivos terem sido

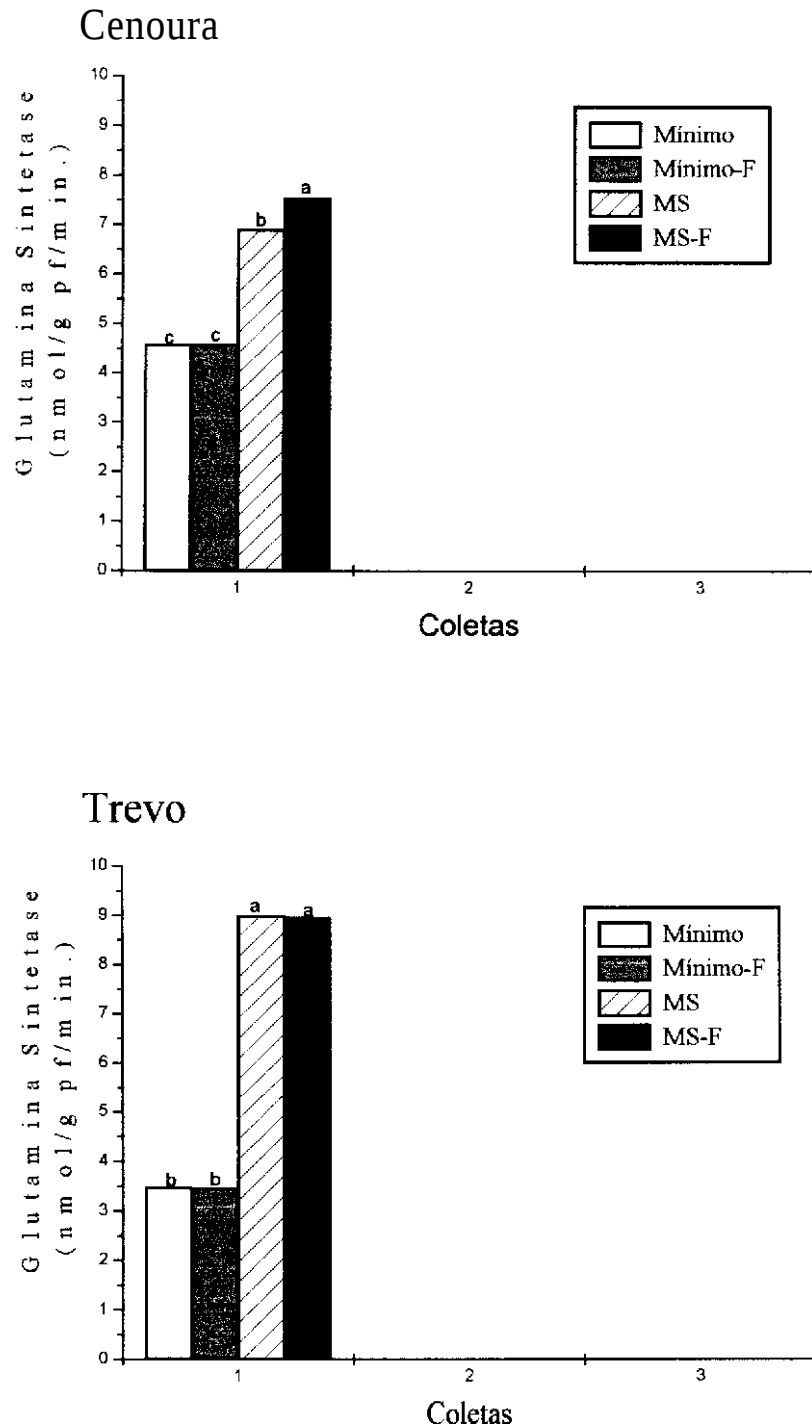


Figura 6: Atividade da Glutamina Sintetase (nmol/g pf/min.) em raízes transgênicas de cenoura e trevo desenvolvidas em meio Mínimo ou MS, com ou sem fungo micorrízico. Coletas 1, 2 e 3 aos 49/21; 84/56 e 132/104 dias de repicagem de raiz/inoculação de fungo. Letras iguais dentro da mesma coleta, não diferem significativamente entre si (Teste Tukey, $p < 0,05$).

elaborados com teores de sacarose baixos, na época destas coletas, as raízes, provavelmente, já tinham exaurido toda a sacarose do meio, pois estavam em adiantada fase de senescência (84 e 131 dias de cultivo, respectivamente, para as coletas 2 e 3). Tal fato pode ser observado nos baixos teores de açúcares solúveis das raízes tanto de cenoura quanto de trevo nestas coletas (Figura 3).

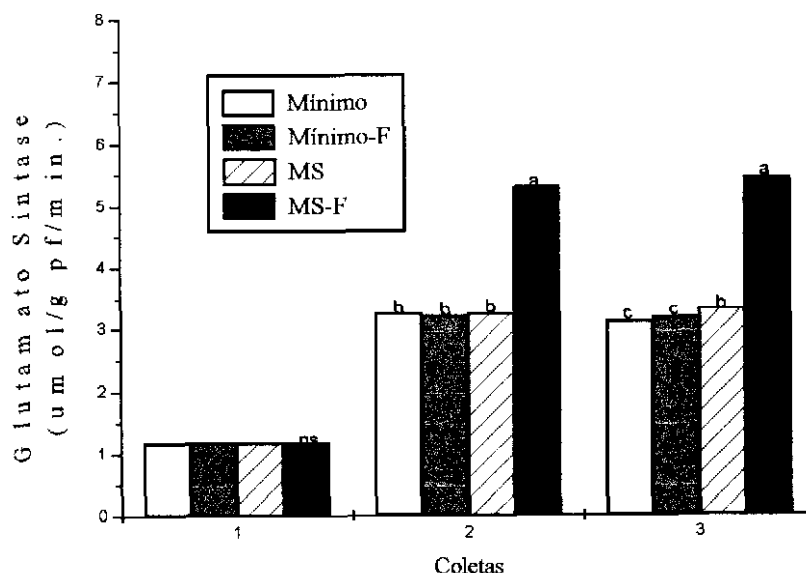
4.7.3 - Atividade da Glutamato Sintase - GOGAT

A atividade da Glutamato Sintase nas raízes de cenoura e de trevo, cultivadas nos meios mínimo e MS, foi crescente durante o ciclo de cultivo. Na coleta 1, as raízes de cenoura e de trevo, não apresentaram diferença significativa com as fontes de N ou presença do FMA. A análise dos tratamentos dentro das coletas 2 e 3, nas raízes de cenoura, demonstraram que o meio MS com o FMA foi o tratamento que apresentou maior atividade da GOGAT e que diferiu significativamente dos demais tratamentos. Para as raízes de trevo, o tratamento com meio MS também apresentou maior atividade desta enzima, mas não foi observado influência do FMA (Figura 7).

Enquanto que para o trevo, a simbiose não influenciou a atividade da GOGAT e nas raízes de cenoura a presença do FMA no meio MS contribuiu para o aumento da atividade da enzima (Figura 7).

A redução de sacarose para o crescimento de tecido vegetal não fotossintético, desencadeia um processo de estresse, devido a limitação de esqueletos de carbono para incorporação do N absorvido, que provavelmente influenciou na atividade da enzima GOGAT. A atividade dessa enzima já foi

Cenoura



Trevo

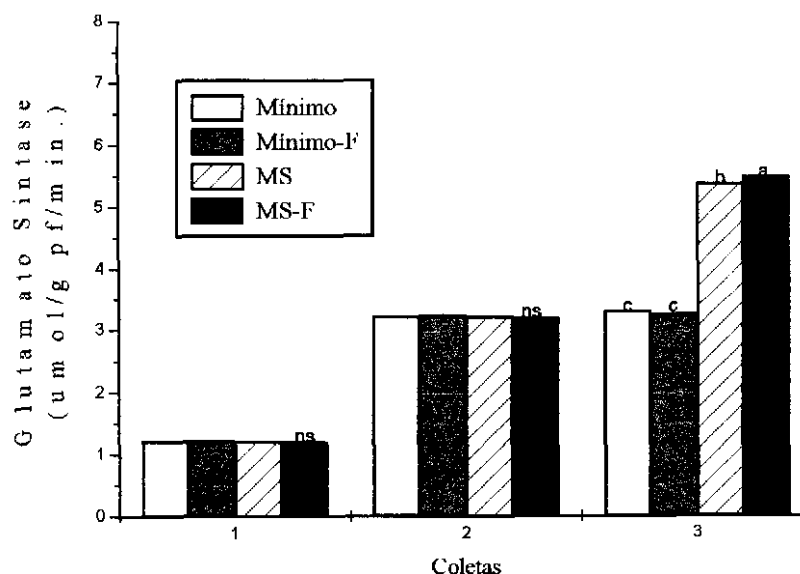


Figura 7: Atividade da Glutamato Sintase trevo (μmol/g pf/min.) em raízes transgênicas de cenoura e desenvolvidas em meio Mínimo ou MS, com ou sem fungo micorrízico. Coletas 1, 2 e 3 aos 49/21; 84/56 e 132/104 dias de repicagem de raiz/inoculação de fungo. Letras iguais dentro da mesma coleta, não diferem significativamente entre si (Teste Tukey, $p < 0,05$).

observada em condições de estresse salino (Mishra & Dwivedi, 1990) e de estresse hídrico (Gamboa et al., 1991).

Apesar da via GS/GOGAT ter sido observada tanto em associações de FMA como de ectomicorrizas (Kershaw & Stewart, 1992; Chalot et al., 1994; Johansen et al., 1996), nas raízes de cenoura e trevo micorrizadas ou não, a atividade da GOGAT no meio MS não acompanhou o aumento observado na atividade da GS (Figuras 6 e 7).

No meio MS, provavelmente, o sistema GS/GOGAT não esteja funcionando em sincronismo, devido a elevada quantidade de N a ser assimilado. Nestas condições a glutamina formada pela GS é uma forma mais apropriada para a neutralização do excesso de NH_4^+ , pois apresenta uma relação carbono /nitrogênio de 5:2, enquanto que a do glutamato formado pela GOGAT é de 5:1. Lorillou et al. (1996) observaram em associações com ectomicorrizas os maiores níveis de glutamina proveniente da ação da GS foram encontrados em cultivos com NH_4^+ .

4.7.4 - Atividade da Glutamato Desidrogenase - GDH

4.7.4.1 - Atividade da GDH aminação (GDH-a)

As RT de cenoura e de trevo durante o ciclo de cultivo apresentaram um aumento significativo da atividade da GDH-a (Figura 8). Resultados semelhantes foram obtidos por Robinson et al. (1992) em suspensão de cultura de células de cenoura, em que a atividade da GDH foi baixa na fase

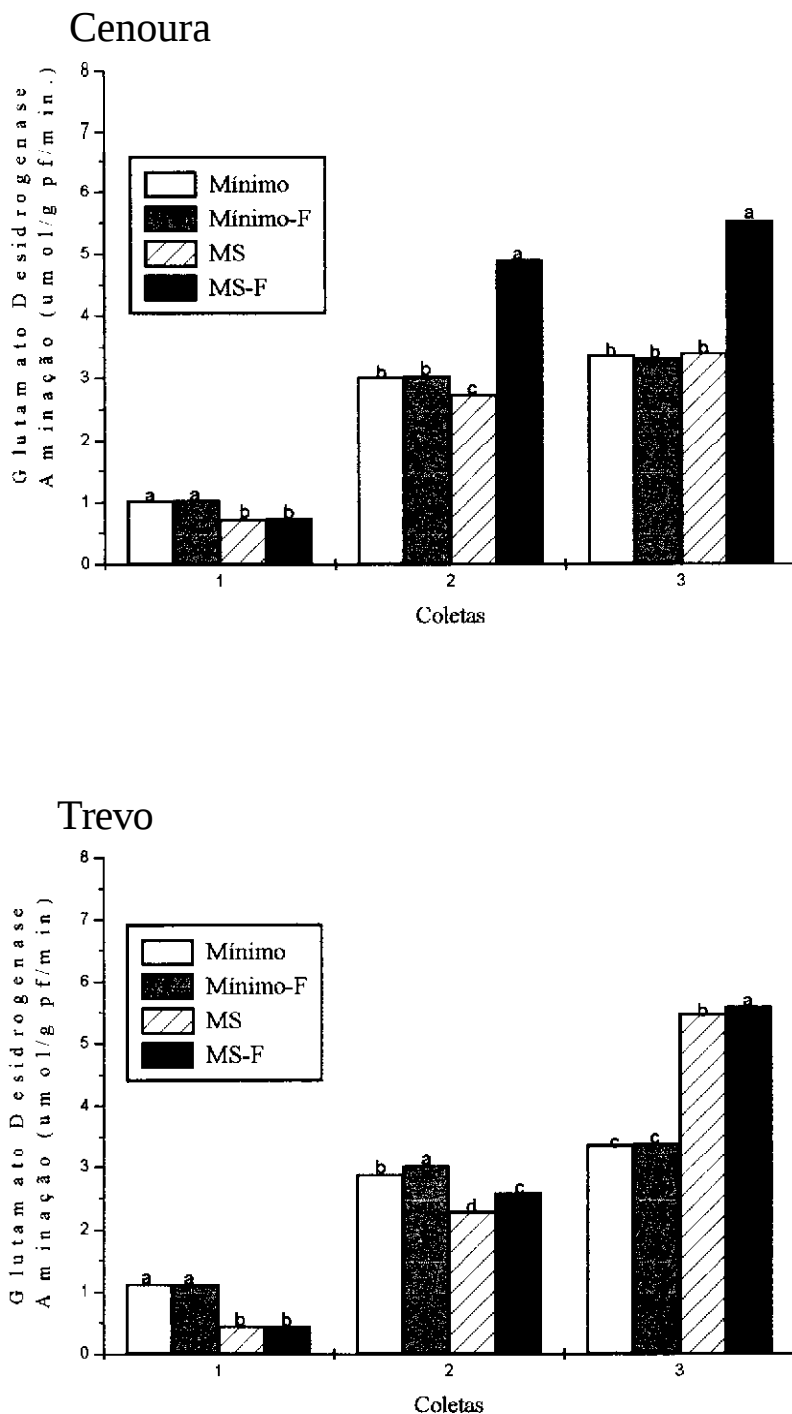


Figura 8: Atividade da Glutamato Desidrogenase a minação (umol/g pf/min.) em raízes transgênicas de cenoura e trevo desenvolvidas em meio Mínimo ou MS, com ou sem fungo micorrízico.

Coletas 1, 2 e 3 aos 49/21; 84/56 e 132/104 dias de repicagem de raiz/inoculação de fungo. Letras iguais dentro da mesma coleta, não diferem significativamente entre si (Teste Tukey, $p < 0,05$).

exponencial do crescimento das células, e aumentando na fase estacionária da cultura.

Nas raízes de cenoura e de trevo, houve maior atividade da GDH-a na coleta 1, quando em meio mínimo, independente do FMA. Nas coletas 2 e 3, as raízes de cenoura apresentaram uma maior atividade no meio MS e inoculadas com o FMA.

A atividade da GDH-a nas raízes de trevo na coleta 2, foi maior quando as raízes foram cultivadas em meio mínimo e na coleta 3, a maior atividade da GDH-a ocorreu nas raízes cultivadas em meio MS, independente da presença do FMA (Figura 8).

Em ambas as raízes o aumento da GDH-a pode ter ocorrido em função da elevada concentração de N no meio MS e também pela senescência do tecido que pode ativar processos que liberam NH_4^+ . A GDH é uma enzima do metabolismo de N que pode ser ativada na senescência e/ou em concentrações altas de NH_4^+ , quando uma rápida detoxificação é necessária (Rhodes et al., 1976; Givan, 1979; Luxová, 1988; Feller, 1990).

A associação das raízes de cenoura com o *G. clarum* em meio MS, favoreceu o aumento da atividade GDH-a nas coletas 2 e 3. Para as raízes de trevo houve aumento dessa enzima apenas na coleta 2, quando essas raízes foram cultivadas também em meio com o meio MS (Figura 8).

A maior concentração de N no meio MS não significou maior atividade da GDH-a nas raízes de cenoura, comparada as raízes de trevo na senescência (Figura 8). Magalhães & Huber (1989), observaram que raízes de arroz, tomate e milho, apresentaram uma maior atividade da GDH quando cultivadas com meio MS (0,30 a 0,78 μmol de NADH oxidado. $\text{min}^{-1}.\text{g}$ pf), do que com o

mínimo (0,21 a 0,34 $\mu\text{mol NADH oxidado}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g pf}$).

Estes valores foram até 6 vezes menores do que os observados nas RT de cenoura e trevo (Figura 8).

A maior atividade da GDH-a nas raízes de trevo cultivadas no meio $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ na coleta 3, possivelmente esteja relacionado com o avançado estágio de senescência da raízes e a maior concentração de N nesse meio, que favoreceu a atividade dessa enzima (Figura 8).

De um modo geral, a enzima Glutamato Desidrogenase na via aminativa (GDHa), detectada nas raízes nos dois meios de cultivo, parece estar operando em conjunto com a enzima GOGAT, pois há uma simetria entre a atividade dessas enzimas. O que não foi observado entre a GS e GOGAT (Figuras 6, 7 e 8). Esta relação entre GOGAT e GDHa, ocorre independente da influência do *Glomus clarum* nas raízes de cenoura e trevo (Figuras 7 e 8).

Lomnitz et al. (1987), em estudos com mutantes de *Neurospora crassa* deficientes em GOGAT, observaram acumulação de glutamato, indicando o papel da GDH na síntese deste aminoácido. Eles propuseram que a GOGAT seria importante na ciclagem de glutamina em condições de excesso de amônio, para a manutenção da taxa de glutamato/glutamina necessária para a distribuição de aminoácidos e amidas aos outros componentes da célula.

4.7.4.2 - Atividade da GDH desaminação (GDHd)

A atividade de GDHd segue o comportamento geral observado para GOGAT e GDHa, aumentando quanto mais tardia for a coleta (Figuras

7, 8 e 9).

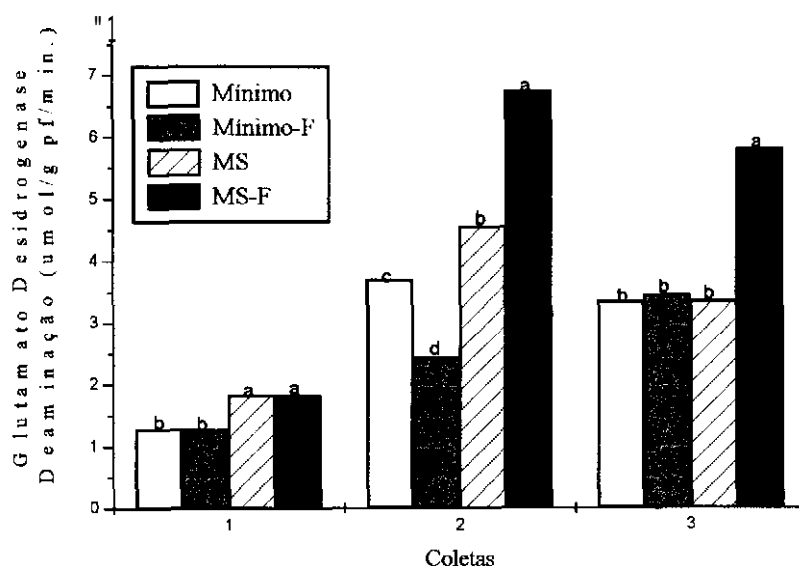
Nas raízes de cenoura e de trevo na primeira coleta a atividade da GDHd, foi semelhante para os dois meios, independente, da presença do FMA. Na coleta 2, as raízes de cenoura apresentaram maior atividade da GDHd quando cultivadas em MS.

Na coleta 3, a atividade da GDHd não apresentou diferença significativa nas raízes de cenoura cultivadas nas diferentes fontes de N, com exceção do meio com MS com fungo que se destacou com maior atividade, como ocorreu na coleta 2 (Figura 9).

Para as raízes de trevo, a atividade da GDHd também foi maior quando essas raízes foram cultivadas em MS, sendo que o FMA reduziu esta atividade. Na coleta 3, a maior atividade da GDHd ocorreu com o cultivo das raízes em meio MS e o FMA não influenciou a atividade da enzima nos dois meios (Figura 9).

A atividade da enzima GDHd, nas raízes de cenoura e de trevo durante todo o ciclo vegetativo, foi de um modo geral maior no meio MS e mais acentuado para as RT de cenoura em associação com o FMA no período de senescência (coletas 2 e 3), que foi maior que os demais (Figura 9). Provavelmente a maior atividade da GDH desaminação no meio MS esteja relacionado a necessidade de esqueletos de carbono para incorporar o excesso de NH_4^+ presente (aproximadamente 50% do total de N desse meio), uma vez que o teor de sacarose fornecido pelo meio de cultura era muito baixo e foi se esgotamento para a manutenção do metabolismo. Em experimento com cultura de cenoura, Robinson et al. (1992) também observaram aumento da atividade da GDH desaminação com a diminuição do suprimento de carboidratos do

Cenoura



Trevo

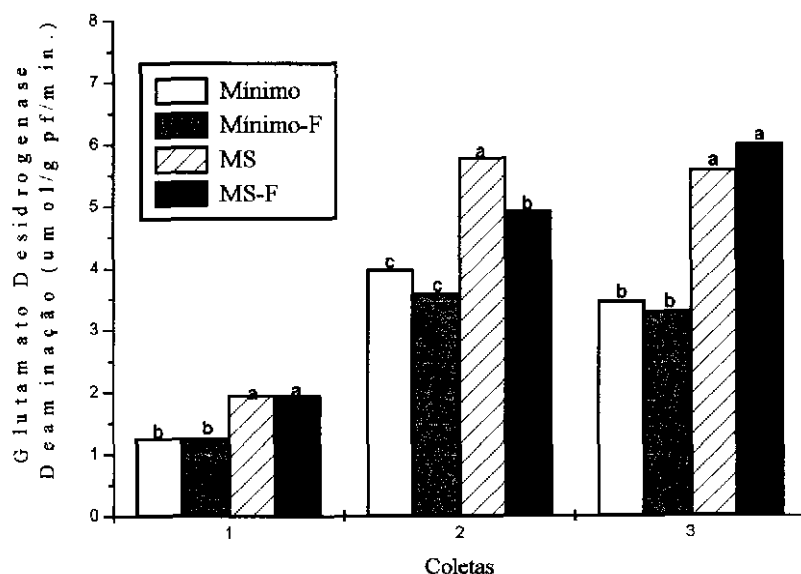


Figura 9: Atividade da Glutamato Desidrogenase desaminação (umol/g pf/min.) em raízes transgênicas de cenoura e trevo desenvolvidas em meio Mínimo ou MS, com ou sem fungo micorrízico.

Coletas 1, 2 e 3 aos 49/21; 84/56 e 132/104 dias de repicagem de raiz/inoculação de fungo. Letras iguais dentro da mesma coleta, não diferem significativamente entre si (Teste Tukey, $p < 0,05$).

meio nutritivo.

Segundo estudos de Atwal et al. (1997), alterações no “status” de ATP, como ocorre em condições de baixa disponibilidade de esqueletos de carbono, aumentam a atividade catabólica da GDH, para o fornecimento de substrato para produção de energia. Assim, o aumento da atividade da GDHd pode estar associada com a necessidade de fornecimento de energia para compensar os distúrbios, causados pelo estresse ou pela senescência (como também observado por Loulakakis et al., 1994), cujas mudanças metabólicas promovem respostas características de diminuição de carbono.

Alguns estudos sugerem que o principal papel da GDH seria o catabolismo do glutamato (desaminação), fornecendo esqueleto de carbono para o ciclo de Krebs sob condições de limitação de carbono, que pode acontecer na senescência ou redução de sacarose para os meios de cultivo *in vitro*. Portanto, a GDH teria uma função de unir o metabolismo de N e de carbono em plantas nesse período de estresse (Cammaerts e Jacobs, 1985; Robinson et al., 1991 e 1992).

Como pode ser observado nas Figuras 8 e 9, a atividade da enzima GDH tanto na via aminativa (GDHa) como desaminativa (GDHd), aumentou com a senescência das raízes de cenoura e de trevo. Durante a senescência, ocorre o catabolismo de proteínas e a desaminação dos aminoácidos produzindo N na forma de amônio, que nestas condições, pode ser incorporado aos tecidos através das vias, GDH e GS / GOGAT (Srivastava & Singh, 1987; Hageman & Bellow, 1990; Chalot et al., 1994; Johansen et al., 1996).

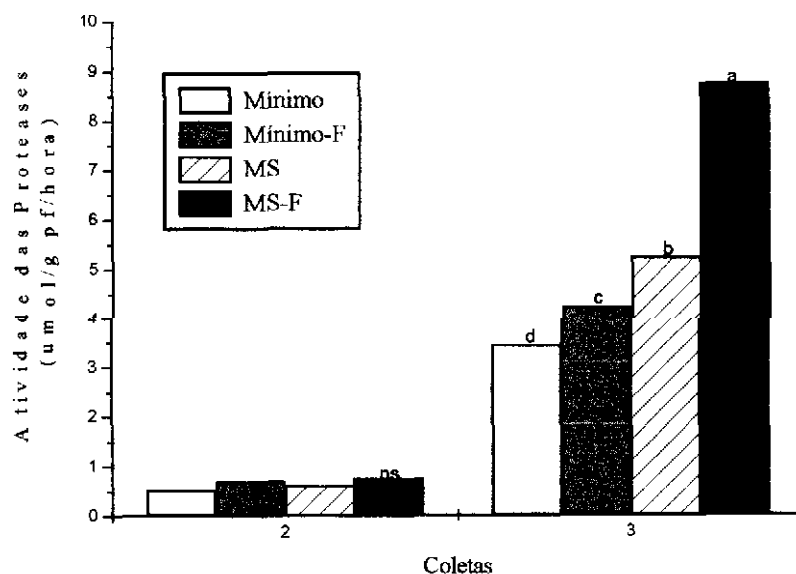
4.7.5 - Atividade das Proteases

A atividade das proteases foi dosada apenas nas coletas 2 e 3. Na coleta 2, a atividade das proteases nas raízes de cenoura não apresentou diferença significativa com as diferentes fontes de N ou inoculação do FMA. Em média, a atividade das proteases foi de 0.64 $\mu\text{mol/g}$ pf/hora. Na coleta 3, as raízes de cenoura apresentaram maior atividade em fonte de N com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ e inoculação do FMA (Figura 10).

Para as RT de trevo desenvolvidas com menor teor de N (meio mínimo apenas com NO_3^-) houve uma menor atividade de proteases e os teores de aminoácidos não foram altos, na coleta 2. Entretanto, quando as raízes foram cultivadas em maior teor de N (meio MS, com $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$), tanto a atividade das proteases como N-amino livre aumentaram (Figuras 2 e 10). Possivelmente, estas respostas estejam relacionadas a alta atividade da GS observada na coleta 1, para o meio MS (Figuras 7 e 8).

Na coleta 3, a atividade das proteases foi maior nos tratamentos em que as raízes de trevo foram cultivadas em meio MS com pequena redução da atividade da protease na presença do FMA (Figura 10). Possivelmente, a redução de sacarose, as fontes e concentração de N e a associação com o *G. clarum* tenham desencadeado um processo diferenciado de estresse e influenciado na intensidade da atividade das proteases. A quantidade de N fornecido para o cultivo parece relacionar-se diretamente com a atividade das protease. Entretanto segundo resultados de Mae & Ohira (1984), plantas não transgênicas de arroz que receberam menores doses de N, apresentaram maior atividade de proteases e teor de N-amino, como também foi observado por

Cenoura



Trevo

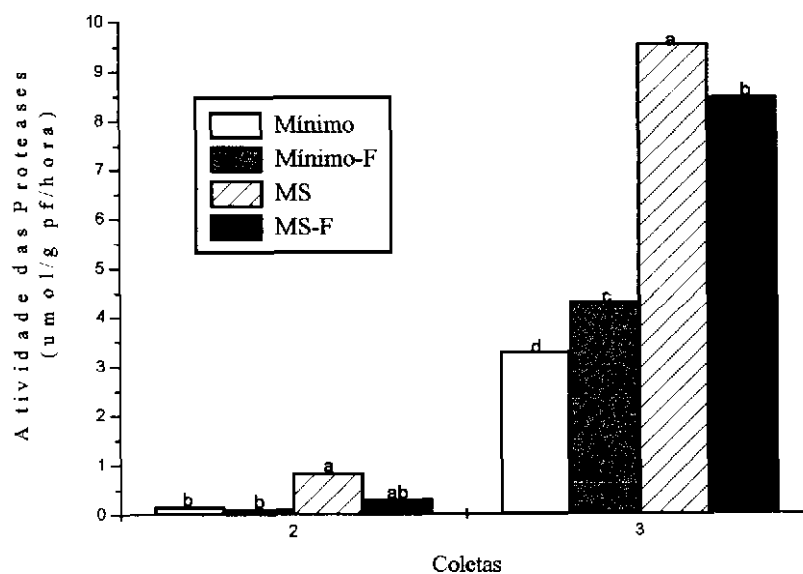


Figura 10: Atividade das Proteases (umol/g pf/h) em raízes transgênicas de cenoura e trevo desenvolvidas em meio Mínimo ou MS, com ou sem fungo micorrízico. Coletas 1, 2 e 3 aos 49/21; 84/56 e 132/104 dias de repicagem de raiz/inoculação de fungo. Letras iguais dentro da mesma coleta, não diferem significativamente entre si (Teste Tukey, $p < 0,05$).

Souza (1995). A maior concentração de N do meio MS influenciou o aumento das proteases, possivelmente devido também a limitação de carbono.

Comparando as Figuras 2, 5, 8, 9 e 10 pode ser constatado que a atividade das proteases, GDH-d, GDH-a e GOGAT aumentam com a senescência das raízes, enquanto os teores de açúcares solúveis, N-amino livre e N-NH_4^+ diminuem. Os açúcares solúveis devem ter sido utilizados para a assimilação do NH_4^+ , entre outros processos metabólicos que demandam energia, produzindo aminoácidos livres.

Com a senescência e com o uso das reservas de carboidratos do meio, há alterações e desvios no metabolismo degradando algumas enzimas e sintetizando ou ativando outras. Isto ocorre como uma tentativa das raízes de manter as funções normais do tecido. Deste modo, é justificado o aumento da atividade de enzimas relacionadas ao catabolismo ou condições de estresse, característicos da senescência, como GDH e proteases.

A indução da atividade das proteases nas RT, possivelmente alterou o padrão das enzimas de assimilação de N (GDH, GOGAT, GS), fornecendo assim aminoácidos e esqueletos de carbono para a síntese de novo de importantes proteínas (Guerrero et al., 1990; Brzin e Kidric, 1995) como uma tentativa de garantir, ao menos por um certo período, a adaptação destas raízes às condições estressantes de cultivo a que foram submetidas.

A atividade das proteases pode ter liberado os aminoácidos (inclusive e / ou principalmente os básicos) e as amidas. A enzima GOGAT, pode ter sido ativada para equilibrar a relação amino/amida, e a GDHd para a obtenção alfa-cetoglutarato (Figuras 7, 9 e 10).

4.8 - PROTEÍNA NOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS

4.8.1 - Proteína do extrato das enzimas de assimilação de N

Como pode ser observado na Figura 11 o teor de proteína obtido nos extratos enzimáticos de GOGAT e GDH aumentou com as coletas, em paralelo ao aumento da atividade dessas enzimas (Figuras 7, 8 e 9).

O maior acúmulo de proteína enzimática foi na coleta 3, nas raízes cultivadas no meio MS, com efeito do fungo apenas para cenoura (Figura 11).

Lorillou et al. (1996) e Lorillou & Martin (1995), observaram que o aumento da atividade da GDH não está relacionado à ativação de precursores da enzima, mas sim à síntese de novo, devido ao aumento da expressão do mRNA que codifica a GDH.

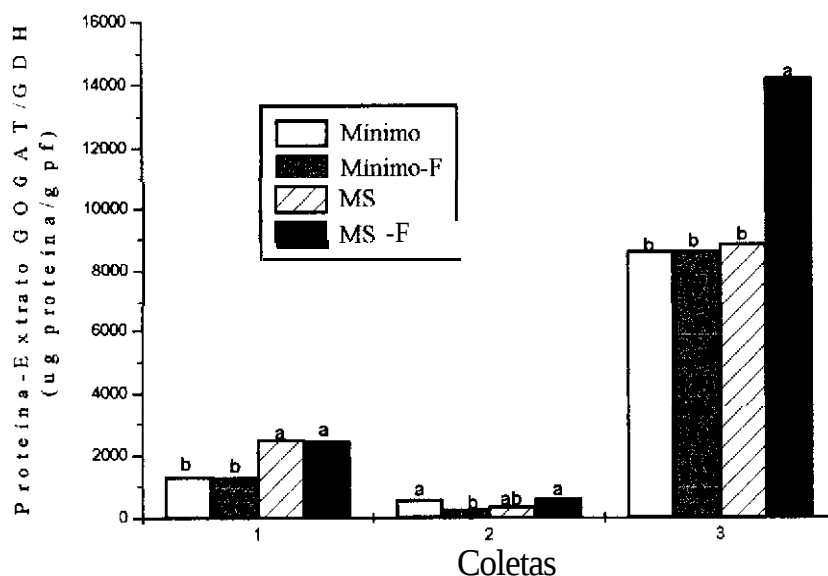
4.8.2 - Proteína do Extrato das Proteases

Como a atividade das proteases foi determinada apenas nas coletas 2 e 3, os teores de proteínas nos extratos enzimáticos também são as destas coletas.

O teor de proteína do extrato das proteases nas raízes de cenoura e de trevo, foi significativamente maior na coleta 2 do que na 3. Para as raízes de cenoura em meio MS, o FMA influenciou aumentando o teor de proteína obtido (Figura 12).

Quando se compara a atividade da protease com o teor de proteína do extrato enzimático (Figuras 10 e 12), pode-se observar que o marcante aumento da atividade das enzimas proteolíticas não é acompanhado pelo aumento na

Cenoura



Trevo

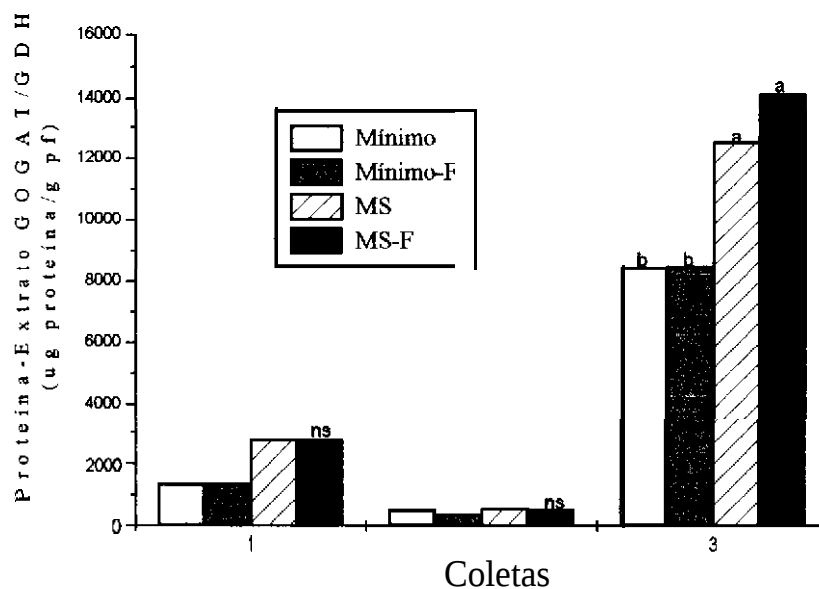
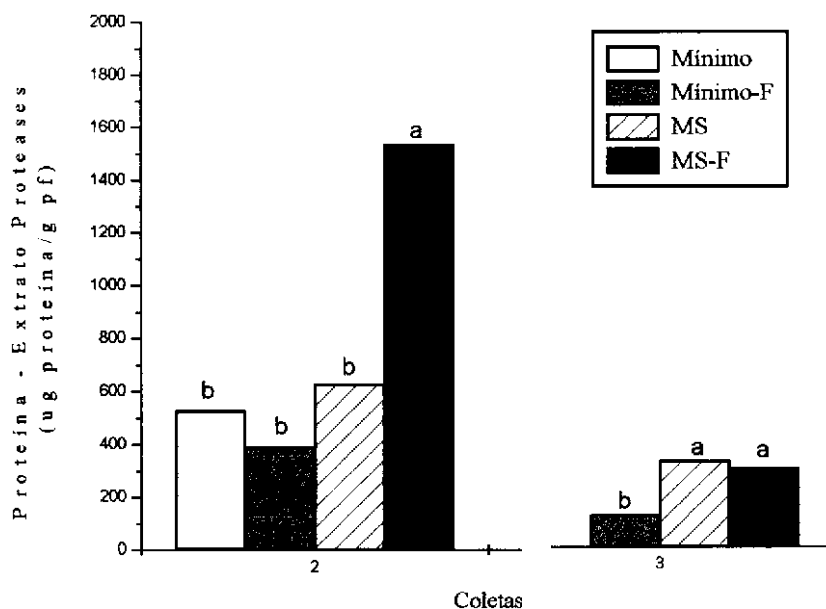


Figura 11: Proteína do extrato das enzimas GOGAT e GDH (ug/g pt) em raízes transgênicas de cenoura e trevo desenvolvidas em meio Mínimo ou MS, com ou sem fungo micorrízico.

Coletas 1, 2 e 3 aos 49/21; 84/56 e 132/104 dias de repicagem de raiz/inoculação de fungo. Letras iguais dentro da mesma coleta, não diferem significativamente entre si (Teste Tukey, $p < 0,05$).

Cenoura



Trevo

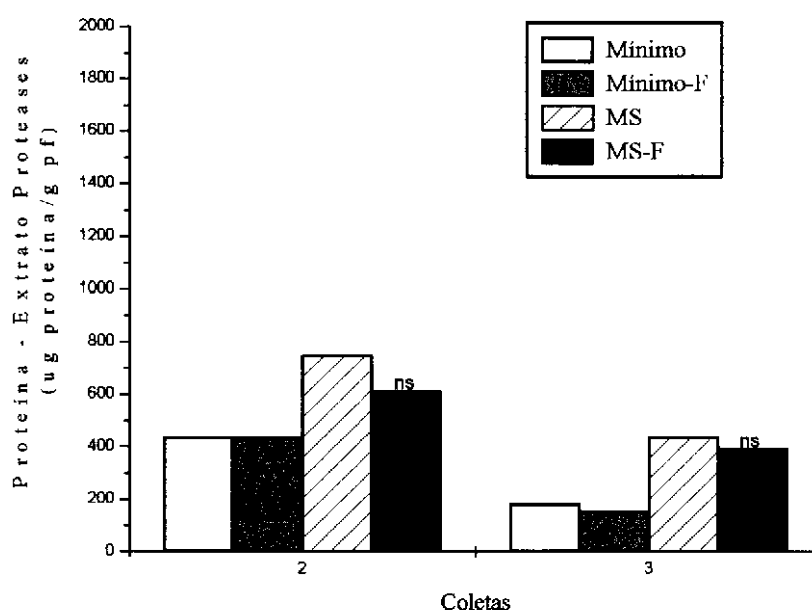


Figura 12: Proteína do extrato das Proteases (ug/g pf) em raízes transgênicas de cenoura e trevo desenvolvidas em meio Mínimo ou MS, com ou sem fungo micorrízico. Coletas 1, 2 e 3 aos 49/21; 84/56 e 132/104 dias de repicagem de raiz/inoculação de fungo. Letras iguais dentro da mesma coleta, não diferem significativamente entre si (Teste Tukey, $p < 0,05$).

quantidade de proteína enzimática, como se observou para as enzimas GOGAT, GDHa e GDHd (Figuras 7, 8, 9 e 11).

Provavelmente na coleta 2, principalmente para a cenoura, havia proteases não ativas, e que se tornaram ativas, posteriormente (coleta 3) (Figuras 10 e 12). Resultados similares foram obtidos por Buchanan-Wollaston (1997) que observaram a ativação de proteases com a senescência.

5 - DISCUSSÃO GERAL

De um modo geral, durante a avaliação do metabolismo das RT de cenoura e de trevo, quer elas estivessem ou não em associação com o FMA, durante os diferentes estádios do desenvolvimento foi observado que houve uma redução dos aminoácidos livres, açúcares solúveis, N-amônio, atividade da GS e proteína do extrato da protease. Porém, paralelamente houve um aumento da atividade das enzimas GOGAT, GDH na função aminativa e desaminativa, proteases e proteína dos extratos das enzimas de assimilação de nitrogênio.

O fato da atividade da enzima GS só ter sido detectada na primeira coleta, aos 49 dias do cultivo, (máximo crescimento exponencial da cultura), não significa que não havia atividade nas coletas seguintes. Hayashi & Chino (1990) e Kamachi et al. (1991 e 1992) observaram que a atividade da GS decresce com o desenvolvimento da cultura e a GOGAT pode permanecer ativa por mais tempo. Segundo Mishra & Dwivedi (1990) e Gamboa et al. (1991) a enzima GOGAT pode estar ativa também em condições de estresse. A partir da coleta 1, as raízes apresentaram um maior estresse de carbono, o que aumentou a atividade da enzima GOGAT e GDH. Com o desenvolvimento máximo das raízes, há uma exaustão dos nutrientes do meio e principalmente

do carbono que já era limitado. Esta deficiência pode ser suprida temporariamente pela atividade das enzimas catabólicas GDH e das proteases, que atuam no catabolismo desses tecidos senescentes. Essas enzimas proteolíticas cortam as ligações peptídicas e liberam os aminoácidos na forma de glutamato e amidas.

No início do cultivo das RT foi observado um grande acúmulo de amônio, devido provavelmente a limitação de carbono para a assimilação do N exógeno, o que também pode ter contribuído para a formação de uma situação de estresse. No processo catabólico, proteínas são hidrolizadas produzindo amônio e aminoácidos, principalmente nas formas amídicas, como glutamina e asparagina (Ghosh et al., 1995).

Mifin & Lea (1977) reportaram que as enzimas de assimilação de nitrogênio, GDH e GOGAT são ativadas tanto na presença de asparagina como de glutamina. Como a GDH possui uma baixa afinidade por amônio (alto K_M), é justificada sua presença nestas condições. Geralmente, nos vegetais o N é assimilado pela via GS/GOGAT que está funcionando em sintonia com o equilíbrio entre glutamina e glutamato. Entretanto, quando a planta está em situação de estresse, estudos evidenciam que a maior parte da assimilação do amônio ocorre pela GDH (Mifin & Lea, 1977; Athwal et al., 1997). Confirmando tais estudos Avendaño et al. (1997) estudando a biossíntese de glutamato na bactéria *Sacharomyces cerevisiae* observaram que ambas as enzimas GDH e GOGAT estão envolvidas na síntese deste aminoácido sob condições de limitação ou excesso de amônio.

Estas observações dão suporte aos resultados obtidos com as RT de cenoura e trevo, de que por estarem em estresse, devido principalmente, a

deficiência de carboidratos do meio e senescência, promovem alterações no metabolismo de N, de maneira que a via GS/GOGAT, deixa de funcionar em sincronismo, sendo substituída por GDH/GOGAT. Este fato parece indicar que a atividade da GOGAT é menos afetada pelas situações de estresse metabólico.

6 - CONCLUSÕES

Os FMA não promoveram modificações expressivas no acúmulo de metabólicos e atividade das enzimas de assimilação de N e proteases, quando em simbiose com RT de cenoura e trevo. Os resultados sugerem que as diferentes respostas observadas, ocorrem devido a estas raízes, após exaurirem do meio toda a reserva de energia e entrarem em senescência alteram seu metabolismo, de maneira a tentar manter suas funções normais. Deste modo, é justificado o aumento da atividade de enzimas relacionadas ao catabolismo ou condições de estresse, característicos da senescência, como GDH e proteases, e principalmente a alteração da via GS/GOGAT, presente nos vegetais, que nas raízes transgênicas estudadas, deixou de atuar em sincronismo, sendo substituída por GDH/GOGAT.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIAS

- ABUZINADAH, R. H.; REID, D. J. The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. I. Utilization of peptides and proteins by ectomycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v. 1986.
- AGERER, R. Colour Atlas of Ectomycorrhizae. Einhorn, Schwäb. Gmünd. 1987.
- AMES, R. N.; REID, C. P.; PORTER, L. K.; CAMBARDELLA C. Hyphal uptake and transport of nitrogen from two ¹⁵N-labelled sources by *Glomus mosseae*, vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. **New Phytologist**, v. 95, p. 381-396, 1983.
- ATWAL, G. S.; PEARSON, J.; LAURIE, S. Regulation of glutamate dehydrogenase activity by manipulation of nucleotide supply in *Daucus carota* suspension cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 101, p.503-509, 1997.
- AVENDÑO, A.; DELUNA, A.; OLIVEIRA, H.; VALENZUELA, L.; GONZALEZ. GDH3 Encodes a Glutamate Dehydrogenase Isozyme, a Previously Unrecognized Route for Glutamate Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bactriology**, set. p.5594-5597, 1997.

- BAGO, B.; VIERHEILIG, H.; PICHÉ, Y.; AZCÓN-AGUILAR, C. Nitrate depletion and pH changes induced by the extraradical mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **New Phytologist**, v. 133, p. 273-280, 1996.
- BÉCARD, G.; PICHÉ, Y. Establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza in root organ culture: review and proposed methodology. **Methods in Microbiology**, v.24, p.89-108, 1992.
- BÉCARD, G.; FORTIN, J. A. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA Transformed roots. **New Phytologist**, v.108, p. 211-218, 1988.
- BELLEI, M. M.; CARVALHO, E. M. S. Ectomicorrizas In: Cardoso, E. J. B. N.; Tsai, S. M.; Neves, M. C. P. (Ed.) Microbiologia do solo. Campinas-SP, p.297-318, 1992.
- BERBARA, R. L. L. Ionic fluxes in arbuscular mycorrhizal systems. PhD. Thesis, University of Dundee, 1995. 215p. (Tese Ph.D.)
- BERBARA, R. L. L.; FONSECA, H. M. A. C. Colonização radicular e esporulação de fungos micorrízicos arbusculares *in vitro*. In: SIQUEIRA, J. O. Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas. ed. Lavras: Universidade Federal de Lavras / DCS e DCF, p. 39-66, 1996.
- BETI-ILENFALVAY, G. J.; FRANSON, R. L. Manganese toxicity alleviated by mycorrhizae in soybean. **Journal Plant Nutrition**, v. 12, p.953-970, 1989.
- BOLAND, M. J.; BENNY, A. G. Enzymes of nitrogen metabolism in legume nodules. Purification and properties of NADH dependent glutamate synthase from lupin nodules. **Eur. J. Biochem.** v.79, p.355-362, 1977.
- BOSH, N., MARTINEZ ALVAREZ, J. R.; PEREZ RODRIGUES M. L. Effect of fertilizer type on nitrate accumulation in vegetables. **Anales Bromatologia**, v.43, n.2/3, p.215-220, 1991.
- BOTTON, B.; CHALOT, M. Nitrogen assimilation: enzymology in ectomycorrhizas. In: Varma, A. K.; Hock, B. (Ed.) **Mycorrhiza**. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, p.325-363, 1995.

- BROWN, M. S.; THAMSURAKUL, S.; BETHLENFALVAY, G. J. The *Glycine-Glomus-Bradyrhizobium* symbiosis. IX.. Phosphorus-use efficiency of CO₂ and N₂ fixation in mycorrhizal soybean. **Physiologia Plantarum**, v.74, p. 159-163, 1988.
- BRZIN, J.; KIDRIC, M. Proteinases and their inhibitors in plants: role in normal growth and in response to various stress conditions. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v.13, p.421-465, 1995.
- BUCHANAN-WOLLASTON, The molecular biology of leaf senescence. **Journal of Experimental Botany**, v.48, p.181-199, 1997.
- CAMMAERTS, D.; JACOBS, M. A study of the role of glutamate dehydrogenase in the nitrogen metabolism of *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, v. 163, p.517-526, 1985.
- CHALOT, M.; BRUN, A.; FINLAY, R. D.; SÖDERSTRÖM, B. Metabolism of [¹⁴C] glutamine by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. **Microbiology**, v. 140, p. 1641-1649, 1994.
- CHALOT, M.; STEWART, G. R.; BRUN, A.; MARTIN, F.; BOTTON, B. Ammonium assimilation by spruce-Hebeloma sp. Ectomycorrhizas. **New Phytologist**, v. 119, p.541-550, 1991.
- CHESSIN, D. A.; HICKS, J. R. The effect of nitrogen fertilizers, herbicides and cultivar on nitrogen components of carrots roots. **Scientia Horticulturae**, v.33, n. 1/2, p.67-73, 1987.
- CLIQUET, J. B.; MURRAY, P. J.; BOUCAUD, J. Effect of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* on the uptake of amino nitrogen by *Lolium perenne*. **New Phytologist**, v. 137, p.345-349, 1997.
- COOPER, K. M. Physiology of Vamycorrhizal associations. In: Powell, C. L.; Bagyaray, D. J. (Ed.) VA mycorrhiza. CRI Press, p. 155-186, 1984.
- COXWELL, M. A.; JOHNSON, C. R. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizae and nitrogen source on growth and transport amino-acid composition of *Pittosporum tobira*. **J. American Society Horticultural Science**, v. 110, n.6, p.800-803, 1985.

- DOUDS, D. D. Jr. A procedure for the establishment of *Glomus mosseae* in dual culture with Ri T-DNA-transformed carrot roots. **Mycorrhiza**, v.7, n.2, p.57-61, 1997.
- ELTROP, L.; MARSCHNER, H. Growth and mineral nutrition of non-mycorrhizal and mycorrhizal Norway spruce (*Picea abies*) seedlings grown in semi-hydroponic sand culture. **New Phytologist**, v.133, p.469-478, 1996.
- FARNDEN, K. J. S.; ROBERTSON, J. G. Methods for studying enzyme involved in metabolism related to nitrogen In: BERGSEN, F. J. ed. **Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation**, 1980.
- FAQUIN, V. Nutrição mineral de plantas. ESAL, FAEPE, Lavras-MG, 1994, p.227.
- FAURE, S.; CLIQUET, J.B.; THEPHANY, G.; BOUCAUD, J. Nitrogen assimilation in *Lolium perenne* colonized by the arbuscular micorrhizal fungus *Glomus fasciculatum*. **New Phytologist**, v.138, p. 411-417, 1998.
- FELLER, U. Nitrogen remobilization and protein degradation during senescence. In: Abrol, Y. P. Nitrogen in higher plants. Research Studies Press Limited, Sommerset, England and John Wiley and Sons Inc. p. 195-222, 1990.
- FERNANDES, M. S. Absorção e metabolismo de nitrogênio em plantas. Itaguaí, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de agronomia, Departamento de Solos, 1978. 50p.
- FERNANDES, M. S. N-carriers, light and temperature. Influences on the free-amino acid pool composition of rice plants. **Turrialba**, v.33, p.297-301, 1983.
- FERNANDES, M. S. Effects of environmental stress on the relationship of free amino-N to fresh weight of rice plants. **Journal Plant Nutrition**. v.14, n.1, p.1155-1164, 1991.
- FERNANDES, M. S.; FREIRE, L. R. Efeitos de nitrogênio nítrico aplicado no solo, na atividade de nitrito-redutase e na acumulação de N-solúvel em *Brachiaria* sp. **Turrialba**, v.26, n.3, p.268-273, 1976.

- FLORES, H. E. Plant roots as chemical factories. **Chem. Ind.**, v.10, p.374-377, 1992.
- FLORES, H.E.; DAI, Y.; CUELLO, J.L; MALDONADO-MENDOZA, I.E.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Green photosynthesis and photoautotrophy in na underground plant organ. **Plant Physiology**, v. 101, p.361-371, 1993.
- FONSECA, H. M. A. C. Some aspects of the physiology of endomycorrhizal plants with associated nitrogen fixing bacteria. PhD Thesis, University of Dundee. 1994.
- FRANCIS, R.; READ, D. J. The contribution of mycorrhizal fungi to the determination of plant community structure. **Plant and Soil**, v. 159, p. 11-25, 1994.
- FURLANI, A. M. C.; BATAGLIA, O. C.; AZZINI, L. E. comportamento diferencial de linhagens de arroz na absorção e utilização de nitrogênio em solução nutritiva. **Revista brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 10, p51-59, 1986.
- GAMBOA, A. VALENZUELA, E. M.; MURILLA, E. Biochemical changes due to water loss in leaves of *Amaranthus hypochondriacus*. **J. Plant Physiol.** v. 137, p.586-590, 1991.
- GENETET, I.; MARTIN, F.; STEWART, G. R. Nitrogen assimilation in mycorrhizas. **Plant Physiology**, v.76, p.395-399, 1984.
- GENTRY, L. E.; WANG, X. T.; BELOW, F. E. Nutrient uptake by wheat seedlings that differ in response to mixed nitrogen nutrition. **Journal of Plant Nutrition**, v. 12, n.3, p.363-373, 1989.
- GEORGE, E.; HÄUSSLER, K. U.; VETTERLEIN, D.; GORGUS, E.; MARSCHNER, H. Water and nutrient translocation by hiphae of *Glomus mosseae*. **Canadian J. Botany**, v.70, p. 2130-2137, 1992.

- GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. A. Espores of mycorrhizal endogone species extraced from soil by wet-sieving and decanting. Tmas sactions of British Mycological Society. **Cambridge**, v.46, p.235-244, 1963.
- GHOSH, S.; PALIYATH, G.; PEIRSON, D.; FLETCHER, R. A. Nitrogen mobilization During senescence. In: Srivastava, H. S.; Singh, R. P. (Ed.) Nitrogen nutrition in higher plants. p.337-365, 1995.
- GIVAN, C.V. Metabolic detoxification of ammonia in higher plants. **Phytochemistry**, v.18, p.375-382, 1979.
- GOGALA, N. Regulation of mycorrhizal infection by hormonal factors produced by hosts and fungi. **Experientia**, v.47, p.331-340, 1991.
- GUERRERO, F. D.; JONES, J. T.; MULLET, J. E. Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes. **Plant Molecular Biology**, v.15, p.11-26, 1990.
- HAMEL, C.; SMITH, D. L. Mycorrhizae-mediated 15N transfer from soybean to com in field-grown intercrops: effect of component crop spatial relationships. **Soil Biol. Biochem.**, v.24, p.499-501, 1992.
- HARLEY, J. L. The biology of mycorrhiza. Leonard Hill, London, 1969.
- HARLEY, J. L.; SMITH, S. E. Mycorrhizal symbiosis. **Academic Press**, 483p., 1983.
- HATCH, A. B. The physical basis of mycotrophy in the genus *Pinus*. Black rock. **Forest Bulletin**, v.6, p. 1-168, 1937.
- HAYASHI, H.; CHINO, M. Chemical composition of phloem sap from the uppermost intemode of the rice plant. **Plant Physiol.** v.31, p.247-251, 1990.
- HIGASHI, K.; KAMADA, H.; HARADA, H. The effects of reduced nitrogenous compounds suggests that glutamine synthetase activity is involved in the development of somatic embryos in carrot. **Plant-Cell-Tissue-and-Organ-Culture**, v.45, n.2, p.109-114, 1996.

- HOWELER, R. H.; ASHER, C. J.; EDWARDS, D. G. Establishment of effective endomycorrhizal association on Cassava in flowing solution culture and its effects on phosphorus nutrition. **New Phytologist**, Oxford, v.90, p.229-238, 1982.
- HUFFAKER, R. C. TANSLEY Review N°. 25. Proteolytic activity during senescence of plants. **New Phytol.** v. 116, p.199-231, 1990.
- JASTROW, J. D.; MILLER, R. M. Methods for assessing the effects of biota on soil structure. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v.34, p.279-303, 1991.
- JAWORSKI, E. G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.43, n.6, p.1274-1279, 1971.
- JENNINGS, D. H. Some perspectives on nitrogen and phosphorus metabolism in fungi. In: Boddy, L.; Marchant, R.; Read, D. J. (Ed.) *Nitrogen, Phosphorus and Sulphur Utilization by Fungi*. Cambridge University Press, Cambridge. 1989.
- JOHANSEN, A.; FINLAY, R. D.; OLSSON, P. A. Nitrogen metabolism of external hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **New Phytologist**, v. 133, p.705-712, 1996.
- JOHANSEN, A.; JAKOBSEN, I.; JENSEN E. S. Hyphal N Transport by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus associated with cucumber grown at three nitrogen levels. **Plant and Soil**, v. 160, p.1-9, 1994.
- KAMACHI, K.; YAMAYA, T.; MAE, T.; OJIMA, K. A role for glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during natural senescence in rice leaves. **Plant Physiology**, v.96, p.411-417, 1991.
- KAMACHI, K.; YAMAYA, T.; HAYAKAWA, T.; MAE, T.; OJIMA, K. Vascular bundle-specific localization of cytosolic glutamine synthetase in rice leaves. **Plant Physiology**, v.99, n.4, p. 1481-1486, 1992.
- KARUNARATNE, R. S.; BAKER, J. H.; BAKER, A. V. Benefits of mycorrhizae to soybean grown on various regimes of nitrogen nutrition. **Journal of Plant Nutrition**, v. 10, n.8, p.871-886, 1987.

- KERSHAW, J. L.; STEWART, G. R.. Metabolism of ^{15}N -labelled ammonium by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Couch. **Mycorrhiza**, v.1, p.71-77, 1992.
- KOTHARI, S. K.; MARSCHNER, H.; RGMHELD, V. Effect of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and rhizosphere microorganisms on manganese reduction in the rhizosphere and manganese concentrations in maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, v. 117, p.649-655, 1991.
- KRAMER, P. J.; BOYER, J. S. **Water relations of plants and soils**. Academic Press. San Diego. 1995.
- KUNZ, A.; LOVATO, P. E. Colonização micorrízica e crescimento de plantas de abacaxi (*Ananas comosus* (L) Merrill) após micropropagação em meios com diferentes concentrações de sacarose. Resumo. FertBIO-98, XXIII Reunião Bras. Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, VII Reunião Brasileira sobre Micorrizas, V Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo e II Reunião Brasileira de Biologia do Solo. Caxambu, MG. 11 a 16 de outubro de 1998, p.197, 1998.
- LAMBAIS, M. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da relação fungo-planta em micorrizas arbusculares. In: SIQUEIRA, J. O. Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas. ed. Lavras: Universidade Federal de Lavras / DCS e DCF, p.5-38, 1996.
- LAMBERT, D. H.; WEIDENSAUL, T. C. Element uptake by mycorrhizal soybean from sewage-sludge-treated soil. **Soil Sci. Soc. Am J.**, v.55, p.393-397, 1991.
- LOMNITZ, A.; CALDERÓN, J.; HERNANDEZ, G.; MORA, J. Functional analysis of ammonium assimilation enzymes in *Neurospora crassa*. **Journal of General Microbiology**, v. 133, p.2333-2340, 1987.
- LORILLOU, S.; BOTTON, B.; MARTIN, F. Nitrogen source regulates the biosynthesis of NADP-glutamate dehydrogenase in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. **New Phytologist**, v.132, p.289-296, 1996.
- LOULAKAKIS, K. A.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. A.; KANELIS, A. K. Regulation of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in

- avocado fruit during development and ripening. **Plant Physiology**, v. 106, n.1, p.217-222, 1994.
- LUXOVÁ, M. The participation of the primary maize root on the assimilation of NH_4^+ ions. **Plant and Soil**, v.111, p.187-189, 1988.
- MACIEL, A. L. R.; CARVALHO, G. R.; PASQUAL, M.; SPERA, M. R. N. Influência do ácido indol butírico no enraizamento *in vitro* de explantes de *Saintpaulia ionantha* WENT. Resumo do V Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal. 16 a 20 de julho de 1995, UFLA, p.124, 1995.
- MAE, T.; OHIRA, K. The relationship between proteolytic activity and loss of soluble protein in rice leaves from anthesis through senescence. **Soil Sci. Plant Nutr.**, v.30, n.3, p.427-434, 1984.
- MAGALHÃES, J. R.; HUBER, D. M. Ammonium assimilation in different plant species as affected by nitrogen form and pH control in solution culture. **Fertilizer Research**. v.21, p.1-6, 1989a.
- MAGALHÃES, J. R.; HUBER, D. M. Growth and ammonium assimilation enzyme activity in response to nitrogen forms and pH control. **J. Plant Nutrition**, v.12, n.8, p.985-996, 1989b.
- MAJEROWICZ, N. Crescimento, assimilação e teores de compostos nitrogenados em plantas de *Catasetum fimbriatum* (Morren) Lindl. (orchidaceae) cultivadas *in vitro* em diferentes fontes de nitrogênio. Instituto de Biociências, USP. Tese de Doutorado. 1997. 133 p.
- MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. **Academic Press**. San Diego. 1995.
- MARSCHNER, H.; DELL, B. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. **Plant Soil**, v. 159, p.89-102, 1994.
- MARTIN, F.; BOTTON, B. Nitrogen metabolism of ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. **Advances in Plant Pathology**, v.9, p.83-102, 1993.
- MARTIN, F.; CHALOT, M.; BRUN, A.; LORILLOU, S.; BOTTON, B. DELL, B. Spatial distribution of nitrogen assimilation pathways in ectomycorrhizas. In: Read, D.; Lewis, D.; Fitter, A.; Alexander, I. eds. **Mycorrhizas In Ecosystems**. Wallingford, 1992.

- MATOH, T.; IDA, S.; TAKAHASHI, E. Isolation and characterization of NADH glutamat synthase from pea (*Pisum sativum* L.) **Plant Cell Pphysiol.** v.21, p.1461-1474, 1980.
- MENGE, J. A. Inoculum prodution. In: POWELL, C. L.; BAGYARAJ, D.J. VA Mycorrhiza. **Boca Raton.** Florida, CRC Press. p. 187-203, 1984.
- MIFLIN, B.J.; LEA, P.J. Amino acid metabolism. **Annual Review Plant Physiology**, v.28, p.299-329, 1977.
- MISHRA, N.; DWIVEDI, U. N. Nitrogen assimilation in germinating *Phaseolus aureus* seeds under saline stress. **J. Plant Physiol.** v. 135, p.719-724, 1990.
- MOSSE, B.; THOMPSON, J. P. Vevicular-arbuscular endomycorrhizal inoculum production. I exploratory experiments with beans (*Phaseolus vulgaris*) in nutrient flow culture. **Canadian Jounal of Botany.** Ottawa, v.62, p. 1523-1530, 1984.
- MUGNIER, J.; MOSSE, B. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in transformed root-inducing T-DNA roots grown axenically. **Phytopathology**, v.77, p.1045-1050, 1987.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant.** v.15, p.473-497, 1962.
- NEWSHAM, K. K.; FITTER, A. H.; WATKINSON, A. R. Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. **Trends Ecol. Evol.**, v.10, p.407-411, 1995.
- OJIMA, K.; OHIRA, K. Nutritional requirements of callus and cell suspension cultures. In: Thorpe, T. A. ed., *Frontiers of plant tissue culture*. Calgary, University of Calgary, p.265-275, 1978.
- OLIVER, A. J.; SMITH, S. E.; NICHOLAS, D. J. D.; WALLACE, W.; SMITH, F. A. Activity of nitrate reductase in *Trifolium subterraneum* L. Effect of mycorrhizal infection and phosphate nutrition. **New Phytologist**, v.94, p.63-79, 1983.
- PAULINO, V. T.; ABREU, J. B. R.; NUSSIO, L. C.; ABBADO, M. R.; BALSALOBRE, M. A.; LUCENA, C.; ANCHÃO, P. P. Respostas de

diferentes espécies de *brachiaria* a fontes de fósforo em presença ou ausência de micorrização. V REBRAM, V Reunião Brasileira sobre Micorrizas. Resumos, Florianópolis, 10 a 14 de outubro de 1994.

PEREIRA, E. G.; PARON, M. E.; SIQUEIRA, J. O.; VALE, F. R.; CURI, N. Resposta de quatro espécies arbóreas, micorrizadas ou não, à formas de N mineral. V REBRAM, V Reunião Brasileira Sobre Micorrizas. Resumos, Florianópolis, 10 a 14 de outubro de 1994.

PIMENTEL, C. Balanço de carbono e os fatores ambientais. In: Pimentel, C. Metabolismo de carbono na agricultura tropical. 1998, p.159.

PLASSARD, C.; MARTIN, F.; MOUSAIN, D.; SALSAC, L. Physiology of nitrogen assimilation by micorrhiza. In: Gianinazzi-Pearson, V.; Gianinazzi, S. (Ed.) Physiological genetical aspects of mycorrhizae. INRA. p.111-120, 1986.

PLASSARD, C.; SCHEROMM, P.; MOUSAIN, D.; SALSAC, L. Assimilation of mineral nitrogen and ion balance in the two partners of ectomycorrhizal symbiosis: Data and hypothesis. **Experientia**, v.47, p.340-349, 1991.

PURANIR, R. M.; SRIVASTAVA, H. S. Increase in NADH-glutamate synthase activity in bean leaf segments by light. **Curr. Sci.** v.59, p.1001-1003, 1990.

QUORESHI, A.; AHMAD, I.; MALLOCH, D.; HELLEBST, J. A. Nitrogen metabolism in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme*. **New Phytol.** v. 131, p.263-271, 1995.

RAJU, P. S.; CLARK, R. B.; ELLIS, J. R.; MARAN VILLE, J. W. Effects of species of VA-mycorrhizal fungi on growth and uptake of sorghum at different temperatures. **Plant Soil**, v.121, p.165-170, 1990.

READ, D. J.; STRIBLEY, D. P. Effect of mycorrhizal infection on nitrogen and phosphorus nutrition of ericaceous plants. **Nature. New Biology**, v.244, p.81-82, 1973.

- REISENAUER, H. M. Absorption and utilization of ammonium nitrogen by plants. in Nielsen, D. R.; MacDonald, J. G. eds. Nitrogen in the Environment. London: **Academic Press**. v.2, p.157-189, 1978.
- RHODES, D.; RENDON, G. A.; STEWART, G. R. The regulation of ammonium assimilating enzymes in *Lemna minor*. **Planta**, v.129, p.203-210, 1976.
- ROBINSON, S. A.; SLADE, A. P.; FOX, G. G.; PHILLIPS, R.; RATCLIFFE, R. G.; STEWART, G. R. The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. **Plant Physiology**, v.95, p.509-516, 1990.
- ROBINSON, S. A.; STEWART, G. R.; PHILLIPS, R. Regulation of glutamate dehydrogenase activity in relation to carbon limitation and protein catabolism in carrot cell suspension cultures. **Plant Physiology**, v.98, p.1190-1195, 1992.
- RYBISTSKAYA, A. S. Nitrate contents in fresh and salted carrots. **Tovarovedenie**, v.24, p.34-36, 1991.
- SIEVERDING, E.; SAIF, S.R. VA mycorrhiza management: a new, low cost, biological technology for crop and pasture production on infertile soils. Discussion paper for CIAT annual review, v.1, 1984.
- SILVIA, D. M. Activity of external hyphae vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Biol. Biochem.** v.20, n.1, p.39-43, 1988.
- SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. **Biotecnologia do solo**. Fundamentos e Perspectivas. Brasília: Ministério da Educação (MEC)/ABEAS/Lavras, ESAL/FAEPE, 235p. 1988.
- SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. DE S.; GRISI, B. M.; HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. Microrganismos e processos biológicos do solo: Perspectiva ambiental. EMBRAPA. 142p. 1994.
- SMITH, S. E.; JOHN, B. J.; SMITH, F. A.; NICHOLAS, D. J. D. Activity of Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in *Allium cepa* L. and *Trifolium subterraneum* L.: Effect of mycorrhizal infection and phosphate nutrition. **New Phytologist**, v.99, p.211-227, 1985.

- SOUZA, F. A.; BERBARA, R. L. L. Development of *Glomus clarum* (NICOLSON & SCHENCK) in Ri T DNA-Transformed Roots. *Mycologia*, Submetido, dezembro de 1997.
- SOUZA, E. S.; BURITY, H. A.; OLIVEIRA, J. P.; FIGUEIREDO, M. V. B.; LYRA, M. C. C. P. Fixação de N₂ e crescimento do calopogônio (*Calopogonium mucunoides* Desv.) e da cunhã (*Clitoria ternatea* L.), após sucessivos cortes. **Sociedade Brasileira de Zootecnia**. v.25, n.6, nov./dez. 1996a.
- SOUZA, E. S.; BURITY, H. A.; ESPÍRITO SANTO, A. C.; SILVA, M. L. R. B. da. Alternativa de produção de inóculo de fungos micorrízicos arbusculares em aeroponia. **Pesq. agropec. bras.** Brasília. v.31, n.2, p.153-158, 1996b.
- SOUZA, S. R. Efeitos da aplicação foliar de nitrogênio pós-antessobre as enzimas de assimilação de N e acúmulo de proteína em grãos de arroz. UFRRJ, 1995, 152p. (Tese de Doutorado).
- SRIVASTAVA, H. S. Nitrate Reductase. In: Nitrogen Nutrition in Higher Plants. Ed. Shivastava, H. S.; Singh, R. P. **Associated Publishing Co.**, New Delhi, India, p.145-164. 1995.
- SRIVASTAVA, H. S.; FLETCHER, R. A. Triademenol treatment of canola seeds increase nitrate reductase activity and nitrate content of leaves. **J. Expt. Bot.** v.43, p.1267-1271, 1992.
- SRIVASTAVA, H. S.; SINGH, R. P. The role and regulation of L-glutamate dehydrogenase activity in higher plants. **Phytochemistry**, v.26, p.597-610, 1987.
- St. JOHN, B. J.; SMITH, S. E.; NICOLAS, D. J. D.; SMITH, F. A. Enzymes of ammonium assimilation in the mycorrhizal fungus *Pezizella ericae* Read. **New Phytologist**, v.100, n.4, p. 579-584, 1985.
- TIDSDALL, J. M. Possible role of soil microorganisms in aggregation of soils. **Plant and Soil**, v. 159, p. 115-121, 1994.
- TINKER, P. B.; JONES, M. D.; DURALL, D. M. A functional comparison of ecto and endomycorrhizas. In: READ, D. J.; LEWIS, D. H. FITTER, A.

- H.; ALEXANDER, I. J. Mycorrhizas in Ecosystems. CAB International, Wellingford, UK. p.303-310, 1992.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. EMBRAPA / CNPH. Brasília, 1990. TINLAND, B. The interaction of T-DNA into plant genomes. **Trends in Plant Sciences**, v.1, p.178-184, 1990.
- URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R. Dinâmica do N no solo. In: I Simpósio brasileiro sobre nitrogênio em plantas. UFRRJ, p.127-167. 1993.
- VARMA, A. Arbuscular mycorrhizal fungi: state of the art. **Critical Reviews Biotechnology**, v. 15, p.179-199, 1995.
- VOGT, K. A.; PUBLICOVER, D. A.; VOGT, D. J. A critique of the role of ectomycorrhizas in forest ecology. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, Amsterdam, v.35, p.171-190, 1991.
- ZAGO, V. C. P. Estudos da aplicação de esterco bovino e uréia nos compostos nitrogenados solúveis em tecidos foliares e na produção de couve. Tese de Mestrado. UFRRJ. 109p. 1997.
- ZANETTE, F.; RIBAS, L. L. F.; DESCHAMPS, C. Efeito do bicloreto de mercúrio no estabelecimento *in vitro* de explantes de carrela-sassafras (*Ocotea odorifera* (Velloso) Rohwer). Resumo do V Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal. 16 a 20 de julho de 1995, UFLA, p.66, 1995.
- ZORNOZA, P.; GONZÁLES, M. Varietal specificity in growth, nitrogen uptake, and distribution under contrasting forms of nitrogen supply in spinach. **Journal of Plant Nutrition**, v.21, n.5, p.837-847, 1998.

ANEXO

Tabela 1 – Peso Fresco das raízes de cenoura e de trevo cultivadas em meio mínimo ou MS com ou sem FMA.

Raiz/coleta	MM	MMF	MS	MSF	Médias
CENOURA					
	g / placa				
1	3,24 a	3,26 a	2,23 b	2,23 b	2,74 A
2	2,23 ab	2,64 a	1,64 bc	1,23 c	1,94 B
3	3,37 a	2,12 b	1,90 b	1,40 b	2,20 B
Médias	2,95 A	2,67 A	1,92 B	1,62 B	
TREVO					
1	2,38 ns	2,37 ns	1,95 ns	1,96 ns	2,16 A
2	2,35 ns	1,80 ns	1,34 ns	1,41 ns	1,72 B
3	2,36 ns	2,23 ns	1,40 ns	1,27 ns	1,82 B
Médias	2,36 A	2,13 A	1,56 B	1,54 B	

Letras minúsculas iguais na mesma linha ou maiúsculas na mesma linha ou coluna, não diferem significativamente entre si ($P < 0,05$).

★ MM - Meio Mínimo; MF - Meio Mínimo com fungo micorrizico; MS - meio Murashige & Skoog; MSF - Murashige & Skoog e com fungo micorrizico.

Tabela 2 – N-amino livres em raízes de cenoura e de trevo cultivadas em meio mínimo ou MS com ou sem FMA.

Raiz/coleta	MM	MMF	MS	MSF	Médias
CENOURA					
	————— umol/g pf —————				
1	13,35 b	13,18 b	94,47 a	93,30 a	53,57 A
2	13,32 b	1,25 d	20,30 a	7,14 c	10,50 B
3	1,17 ab	0,00 b	4,71 a	2,08 ab	1,99 C
Médias	9,28 C	4,81 D	39,83 A	34,17 B	
TREVO					
1	18,03 b	17,87 b	139,73 a	138,89 a	78,63 A
2	22,70 c	5,79 d	53,39 a	41,81 b	30,92 B
3	1,25 a	3,26 a	4,65 a	2,43 a	2,90 C
Médias	14,00 C	8,97 D	65,92 A	61,04 B	

Letras minúsculas iguais na mesma linha ou maiúsculas na mesma linha ou coluna, não diferem significativamente entre si ($P < 0,05$).

★ MM - Meio Mínimo; MMF - Meio Mínimo com fungo micorrízico; MS - meio Murashige & Skoog; MSF - Murashige & Skoog e com fungo micorrízico.

Tabela 3 - Açúcares solúveis em raízes de cenoura e de trevo cultivadas em meio mínimo ou MS com ou sem FMA.

Raiz/coleta	MM	MMF	MS	MSF	Médias
CENOURA					
	mg/g pf				
1	83,92 a	88,82 a	39,80 b	42,26 b	63,70 A
2	6,76 a	3,18 a	5,84 a	0,00 a	3,94 B
3	3,18 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,79 B
Médias	31,29 A	30,67 A	15,21B	14,08 B	
TREVO					
1	52,06 b	50,94 b	88,82 a	83,92 a	68,94 A
2	14,29 b	13,43	28,55 a	10,37 b	16,66 B
3	0,00	0,00	0,00	6,01 ns	1,50 C
Médias	22,12 C	21,46 C	39,12 A	33,43 B	

Letras minúsculas iguais na mesma linha ou maiúsculas na mesma linha ou coluna, não diferem significativamente entre si ($P < 0,05$).

★ MM - Meio Mínimo; MMF - Meio Mínimo com fungo micorrízico; MS - meio Murashige & Skoog; MSF - Murashige & Skoog e com fungo micorrízico.

Tabela 4 - N-nitrato em raízes de cenoura e de trevo cultivadas em meio mínimo ou MS com ou sem FMA.

Raiz/coleta	MM	MMF	MS	MSF	Médias
CENOURA					
	umol/g pf				
1	0,00 ns	0,00 ns	0,00 ns	0,00 ns	0,00 B
2	18,90 a	18,90 a	0,00 b	0,00 b	9,45 A
3	18,90 a	18,90 a	0,00 b	0,00 b	9,45 A
Médias	12,60 A	12,60 A	0,00 B	0,00 B	
TREVO					
1	0,00	0,00	47,24	47,24	23,62
2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Médias	0,00	0,00	15,75	15,75	

Letras minúsculas iguais na mesma linha ou maiúsculas na mesma linha ou coluna, não diferem significativamente entre si ($P < 0,05$).

★ M - Meio Mínimo; MF - Meio Mínimo com fungo micorrízico; MS - meio Murashige & Skoog; MSF - Murashige & Skoog e com fungo micorrízico.

Tabela 5 - N-amônio em raízes de cenoura e de trevo cultivadas em meio mínimo ou MS com ou sem FMA.

Raiz/coleta	MM	MMF	MS	MSF	Médias
CENOURA					
	umol/g pf				
1	1,55 b	1,68 b	5,38 a	5,68 a	3,57 A
2	0,65 c	0,88 c	2,80 a	1,38 b	1,43 B
3	0,15	0,12	0,23	0,25 ns	1,19 C
			2		
Médias	0,78 C	0,89 C	,80 A	2,44 B	
TREVO					
1	0,31 b	0,35 b	8,98 a	9,11 a	4,69 A
2	0,68 b	0,27 b	4,05 a	4,47 a	2,36 B
3	0,15 ns	0,13	0,18	0,11	0,14 C
Médias	0,38 B	0,25 B	4,40 A	4,56 A	

Letras minúsculas iguais na mesma linha ou maiúsculas na mesma linha ou coluna, não diferem significativamente entre si ($P < 0,05$).

★ MM - Meio Mínimo; MMF - Meio Mínimo com fungo micorrízico; MS - meio Murashige & Skoog; MSF - Murashige & Skoog e com fungo micorrízico.

Tabela 6 - Atividade da GS em raízes de cenoura e de trevo cultivadas em meio mínimo ou MS com ou sem FMA.

Raiz/coleta	MM	MMF	MS	MSF	Médias
CENOURA					
	nmol/g pf/min				
1	4,57 c	4,57 c	6,89 a	7,52 b	5,89 A
2	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 B
3	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 B
Médias	1,52 B	1,52 B	2,30 A	2,51 A	
TREVO					
1	3,47 b	3,44 b	8,98 a	8,95 a	6,21 A
2	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 B
3	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 B
Médias	1,16 B	1,15 B	2,99 A	2,98 A	

Letras minúsculas iguais na mesma linha ou maiúsculas na mesma linha ou coluna, não diferem significativamente entre si ($P < 0,05$).

★ MM - Meio Mínimo; MMF - Meio Mínimo com fungo micorrízico; MS - meio Murashige & Skoog; MSF - Murashige & Skoog e com fungo micorrízico.

Tabela 7 - Atividade da GOGAT em raízes de cenoura e de trevo cultivadas em meio mínimo ou MS com ou sem FMA.

Raiz/coleta	MM	MMF	MS	MSF	Médias
CENOURA ————— umol/g pf/min —————					
1	1,18 a	1,18 a	1,18 a	1,18 a	1,18 B
2	3,26 b	3,21 b	3,25 b	5,31 a	3,76 A
3	3,12 c	3,18 c	3,31 b	5,44 a	3,76 A
Médias	2,52 B	2,52 B	2,58 B	3,98 A	
TREVO					
1	1,21	1,21	1,20	1,20 n/s	1,21 C
2	3,21	3,23	3,21	3,20 n/s	3,21 B
3	3,29 c	3,25 c	5,36 b	5,48 a	4,34 A
Médias	2,57 B	2,56 B	3,26 A	3,29 A	

Letras minúsculas iguais na mesma linha ou maiúsculas na mesma linha ou coluna, não diferem significativamente entre si ($P < 0,05$).

★ MM - Meio Mínimo; MMF - Meio Mínimo com fungo micorrízico; MS - meio Murashige & Skoog; MSF - Murashige & Skoog e com fungo micorrízico.

Tabela 8 - Atividade da Glutamato Desidrogenase aminação em raízes de cenoura e de trevo cultivadas em meio mínimo ou MS com ou sem FMA.

Raiz/coleta	MM	MMF	MS	MSF	Médias
CENOURA					
	————— umol/g pf/min —————				
1	1,03 a	1,03 a	0,72 b	0,73 b	0,88 C
2	3,02 b	3,03 b	2,73 c	4,90 a	3,42 B
3	3,36 b	3,32 b	3,39 b	5,52 a	3,90 A
Médias	2,28 C	2,46 B	2,47 B	3,72 A	
TREVO					
1	1,12 a	1,12 a	0,45 b	0,45 b	0,78 A
2	2,87 b	3,02 a	2,28 d	2,57 c	2,68 B
3	3,36 c	3,39 c	5,47 b	5,58 a	4,45 C
Médias	2,45 C	2,51 C	2,74 B	2,87 A	

Letras minúsculas iguais na mesma linha ou maiúsculas na mesma linha ou coluna, não diferem significativamente entre si ($P < 0,05$).

★ MM - Meio Mínimo; MMF - Meio Mínimo com fungo micorrízico; MS - meio Murashige & Skoog; MSF - Murashige & Skoog e com fungo micorrízico.

Tabela 9 - Atividade da Glutamato Desidrogenase desaminação em raízes de cenoura e de trevo cultivadas em meio mínimo ou MS com ou sem FMA.

Raiz/coleta	MM	MMF	MS	MSF	Médias
CENOURA					
	umol/g pf/min				
1	1,27 b	1,27 b	1,82 a	1,82 a	1,54 C
2	3,69 c	2,43 d	4,56 b	6,74 a	4,35 A
3	3,34 b	3,43 b	3,34 b	5,79 a	3,98 B
Médias	2,76 C	2,38 D	3,24 B	4,78 A	
TREVO					
1	1,25 b	1,25 b	1,94 a	1,95 a	1,60 B
2	3,98 c	3,59 c	5,78 a	4,93 b	4,57 A
3	3,46 b	3,29 b	5,58 a	6,00 a	4,58 A
Médias	2,90 B	2,71 B	4,43 A	4,29 A	

Letras minúsculas iguais na mesma linha ou maiúsculas na mesma linha ou coluna, não diferem significativamente entre si ($P < 0,05$).

★ M - Meio Mínimo; MF - Meio Mínimo com fungo micorrízico; MS - meio Murashige & Skoog; MSF - Murashige & Skoog e com fungo micorrízico.

Tabela 10 - Atividade das proteases no T. 120, em raízes de cenoura e de trevo cultivadas em meio mínimo ou MS com ou sem FMA.

Raiz/coleta	MM	MMF	MS	MSF	Médias
CENOURA					
	————— umol/g pf/h —————				
2	0,52 a	0,68 a	0,59 a	0,74 a	0,64 B
3	3,42 d	4,22 c	5,22 b	8,71 a	5,40 A
Médias	1,98 C	2,45 BC	2,90 B	4,72 A	
TREVO					
2	0,16 b	0,100 b	0,82 a	0,30 ab	0,35 B
3	3,28 d	4,28 c	9,52 a	8,43 b	6,38 A
Médias	1,72 D	2,19 C	5,18 A	4,36 B	

Letras minúsculas iguais na mesma linha ou maiúsculas na mesma linha ou coluna, não diferem significativamente entre si ($P < 0,05$).

★ MM - Meio Mínimo; MMF - Meio Mínimo com fungo micorrízico; MS - meio Murashige & Skoog; MSF - Murashige & Skoog e com fungo micorrízico.

Tabela 11 - Proteína do extrato das enzimas de assimilação de N em raízes de cenoura e de trevo cultivadas em meio mínimo ou MS com ou sem FMA.

Raiz/coleta	MM	MMF	MS	MSF	Médias
CENOURA ————— nmol/g pf/min —————					
1	1299,10 b	1270,27 b	2481,08 a	2445,05 b	1873,88 A
2	566,21 a	273,97 b	347,03 b	590,56 a	444,44 B
3	8525,49 a	8525,49 a	8760,78 a	14209,15 a	10005,22 C
Médias	3464,00 C	3356,58 C	3862,96 B	5748,25 A	
TREVO					
1	1329,73 a	1329,72 a	2763,97 a	2763,97 a	2046,85 B
2	493,15 a	347,03 a	529,68 a	493,15 a	465,75 C
3	8447,06ba	8486,27 b	12501,96 a	14143,79 a	10894,77 A
Médias	3423,31 B	3387,68 B	5265,20 A	5800,30 A	

Letras minúsculas iguais na mesma linha ou maiúsculas na mesma linha ou coluna, não diferem significativamente entre si ($P < 0,05$).

★ MM - Meio Mínimo; MMF - Meio Mínimo com fungo micorrízico; MS - meio Murashige & Skoog; MSF - Murashige & Skoog e com fungo micorrízico.

Tabela 12 - Proteína do extrato das proteases em raízes de cenoura e de trevo cultivadas em meio mínimo ou MS com ou sem FMA.

Raiz/coleta	MM	MMF	MS	MSF	Médias
CENOURA ————— umol/g pf/min —————					
2	526,58 b	391,14 b	626,58 b	1534,18 a	769,62 A
3	0,00 b	121,39 ab	328,85 a	299,34 ab	187,40 B
Médias	263,29 BC	256,27 C	477,72 B	916,76 A	
TREVO					
2	433,31	433,34	746,85	610,97	556,12 A
3	179,60	154,73	436,15	390,38	290,22 B
Médias	306,46 B	294,03 B	591,50 A	500,68 A	

Letras minúsculas iguais na mesma linha ou maiúsculas na mesma linha ou coluna, não diferem significativamente entre si ($P < 0,05$).

★ MM - Meio Mínimo; MMF - Meio Mínimo com fungo micorrízico; MS - meio Murashige & Skoog; MSF - Murashige & Skoog e com fungo micorrízico.