



**Estudo da Ontogenia da Colonização e Esporulação de Fungos  
Micorrízicos Arbusculares (MA) em Raízes Transgênicas de  
*Trifolium Repens* L. e *Daucus Carota* L.**



**República Federativa do Brasil**

**Presidente**

Fernando Henrique Cardoso

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

**Ministro**

Francisco Turra

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa

**Diretor Presidente**

Alberto Duque Portugal

**Diretores**

Elza Ângela Battaggia Brito da Cunha

Dante Daniel Giacomelli Scolari

José Roberto Rodrigues Peres

**Chefias da Agrobiologia**

Chefe Geral: Maria Cristina Prata Neves

Chefe Adj. de Pesq. e Desenvolvimento: Sebastião Manhães Souto

Chefe Adjunto Administrativo: Vanderlei Pinto

DOCUMENTO Nº 62

ISSN 0104-6187

Novembro 1998

**Estudo da Ontogenia da Colonização e Esporulação de Fungos  
Micorrízicos Arbusculares (MA) em Raízes Transgênicas de  
*Trifolium Repens* L. e *Daucus Carota* L.**

Francisco Adriano de Souza  
Ricardo Luiz Louro Berbara

Seropédica - RJ  
1998

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa *Agrobiologia*  
Caixa Postal 74505  
23851-970 - Seropédica – RJ  
Telefone: (021) 682-1500  
Fax: (021) 682-1230  
e-mail: [adc@cnpab.embrapa.br](mailto:adc@cnpab.embrapa.br)

**Expediente:**

Revisor: Sebastião Manhães Souto

Normalização Bibliográfica/Confecção/Padronização: Dorimar dos Santos Felix  
Sérgio Alexandre Lima

Comitê de Publicações: Sebastião Manhães Souto(Presidente)

Johanna Döbereiner

José Ivo Baldani

Norma Gouvêa Rumjanek

José Antonio Ramos Pereira

Paulo Augusto da Eira

Dorimar dos Santos Felix(Bibliotecária)

SOUZA, F.A. de; BERBARA, R.L.L. **Estudo da Ontogenia da Colonização e Esporulação de Fungos Micorrízicos Arbusculares (MA) em Raízes Transgênicas de *Trifolium Repens* L. e *Daucus Carota* L..** Seropédica: Embrapa *Agrobiologia*, nov. 1998. 20p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 62).

ISSN 0104-6187

1. Fungo. 2. Micorriza. I. Berbara, R.L.L., colab. II. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). III. Título. IV. Série.

CDD 795.5

# SUMÁRIO

<b>1. RESUMO.....</b>	<b>4</b>
<b>2. RESULTADOS .....</b>	<b>5</b>
<b>3. PUBLICAÇÕES .....</b>	<b>14</b>
<b>4. ANEXOS.....</b>	<b>14</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>19</b>

# Estudo da Ontogenia da Colonização e Esporulação de Fungos Micorrízicos Arbusculares (MA) em Raízes Transgênicas de *Trifolium Repens L.* e *Daucus Carota L.*

Francisco Adriano de Souza<sup>1</sup>  
Ricardo Luiz Louro Berbara<sup>2</sup>

## 1. Resumo

Os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) se destacam por formarem associação simbiótica com pelo menos 80% das plantas fanerogâmas terrestres, sendo considerada a simbiose mais comum entre microrganismos e plantas. Estes contribuem para o crescimento destas, principalmente, através da absorção e translocação de nutrientes, notadamente, o fósforo. Por serem biotróficos obrigatórios, estes fungos precisam estabelecer associação efetiva com raízes metabolicamente ativas para que possam se desenvolver, o que vem dificultando tanto estudos básicos como sua aplicação agrícola. Recentemente vários pesquisadores obtiveram colonização e esporulação de FMAs em raízes transgênicas crescidas em condições axênicas. Estes podem ser mantidas em placas de petri o que permite o acompanhamento diário dos eventos envolvidos no processo de infecção e desenvolvimento do fungo no interior de raízes, representando assim um excelente modelo para estudo do processos envolvidos na simbiose raiz-fungo. Este subprojeto tem por objetivos desenvolver estudos básicos sobre a colonização e esporulação de FMAs. Neste sentido, foram avaliados o crescimento micelial e ontogenia de seis espécies de FMAs em raízes Ri T-DNA transformadas. As espécies avaliadas foram: *Glomus etunicatum*, *G. clarum*, *Gigaspora gigantea*, *G. margarita*, *Scutellospora heterogama* e *S. gregaria*. Das espécies estudadas, com exceção do *Glomus etunicatum* e da *Scutellospora gregaria*, todas foram capazes de completar o ciclo, formando novos esporos. Durante a ontogenia dos esporos de *G. clarum* foi observado que os esporos são formados intercaladamente nas hifas esporogênicas, o que representa um padrão de formação de esporos que difere do

---

<sup>1</sup> Pesquisador da Embrapa *Agrobiologia*, Caixa Postal: 74505, CEP: 23851-970, Seropédica-RJ.

<sup>2</sup> Professor da UFRRJ

gênero *Glomus*. Foi constatado também que os esporos vegetativos ("spore-like vesicles") formados durante a fase de crescimento assimbiótico do *Glomus clarum* são esporos no seu estado juvenil, evidenciando que esta espécie apresenta capacidade para dar início a formação de esporo, durante a fase de crescimento assimbiótico. Durante o período foi realizado 66.6% do programado para a meta 1 e 75% do programado para a meta 2. Com o objetivo de melhor caracterização do metabolismo das raízes transformadas e suas relações com processos simbióticos associados a colonização e esporulação de *Glomus clarum*, foram avaliadas: novas composições de meio de cultura suplementados com diferentes formas de nitrogênio, a atividade de proteases e de enzimas ligadas ao metabolismo do nitrogênio (Nitrito Redutase "NR" e Glutamina Sintetase "GS"). E foram determinados também N-amino, açúcares solúveis, nitrato e amônio, bem como as taxas de crescimento das raízes e a esporulação. O protocolo para obtenção de raízes autotróficas ainda não foi ajustado, o que retardou o atingimento das metas 03 e 04, que se referem ao estudos de sinais envolvidos na esporulação de FMAs. Foram introduzidas alterações e atividades futuras.

## 2. Resultados

Crescimento micelial e ontogenia de seis espécies de FMAs em raízes Ri T-DNA transformadas. Foram avaliadas as espécies *Glomus etunicatum*, *G. clarum*, *Gigaspora gigantea*, *G. margarita*, *Scutellospora heterogama* e *S. gregaria*.

MATERIAL E MÉTODOS: Esporos das espécies estudadas foram desinfestados superficialmente e germinados em ágar-água pH 6,0. Após germinação, um a cinco esporos foram transferidos para placas de petri (8 cm Ø) contendo meio de crescimento, bem como um fragmento (3 a 4 cm) apical de raiz transformada. As culturas monoxênicas cresceram por períodos de 5 a 8 meses.

1. Das espécies estudadas, com exceção do *Glomus etunicatum* e da *Scutellospora gregaria*, todas foram capazes de completar o ciclo, formando novos esporos. Dentre estas o *G. clarum* (853) apresentou a maior taxa de esporulação seguindo de *Gi. margarita* (49), *S. heterogama* (14) e *Gi. Gigantea* (1). A ausência de esporulação para os fungos *G. etunicatum* e *S. gregaria* foi devido a baixa infectividade deste fungo. Concentrações mais baixas de sacarose e a utilização de raízes transformadas de batata-doce e mandioca serão testadas afim de obter a esporulação desta espécie. A baixa taxa de esporulação do fungo *Gi. gigantea* foi devido a perda

das placas por problemas de contaminação. Novas culturas serão iniciadas a partir da extração e desinfestação de esporos produzidos durante o ano de 1997.

2. *Gi. margarita* e *S. heterogama* apresentaram padrão similar de desenvolvimento durante todo o ciclo, produzindo densa rede micelial, com características similares de desenvolvimento, porém *Gi. margarita* apresentou enovelamento de hifas não observado em *S. heterogama*. Esta estrutura será melhor avaliada visto que não há relatos dela na literatura (Figuras 1 e 2).

3. Durante a ontogenia dos esporos de *G. clarum* foi observado que os esporos são formados intercaladamente nas hifas esporogênicas. Assim, o *Glomus clarum* apresenta um padrão de formação de esporos que difere do gênero *Glomus*. Foi constatado também que os esporos vegetativos ("spore-like vesicles") formados durante a fase de crescimento assimbiótico do *Glomus clarum* são esporos no seu estado juvenil, evidenciando que esta espécie apresenta capacidade para dar início a formação de esporo, durante a fase de crescimento assimbiótico. Estes resultados foram submetidos para publicação na revista *Mycologia* (Objetos incorporados 3, 4, 5 e 6).

Estes resultados demonstram a viabilidade do cultivo monoxênico de FMAs em raízes transformadas e sua aplicação em estudos de ecologia e taxonomia destes simbioses.



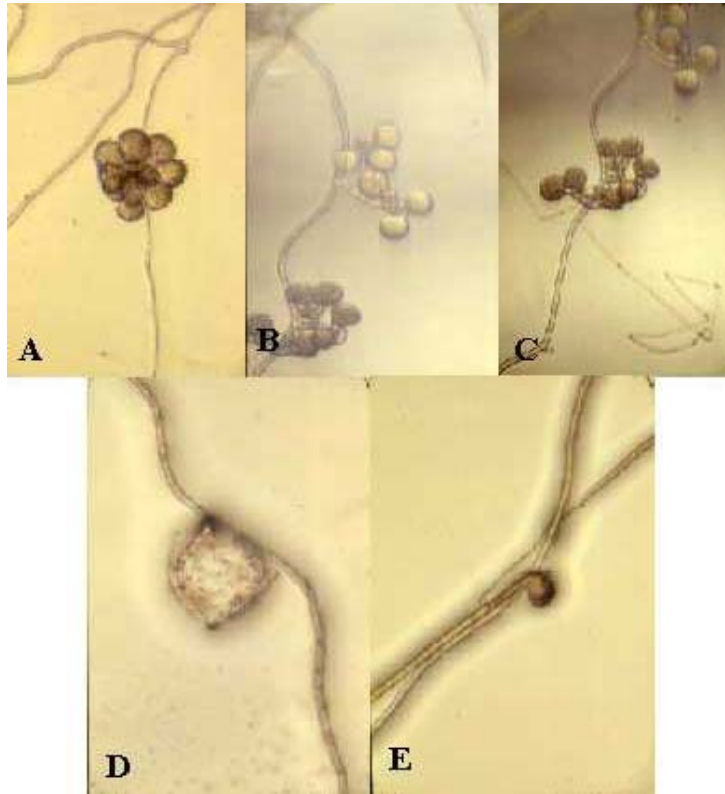
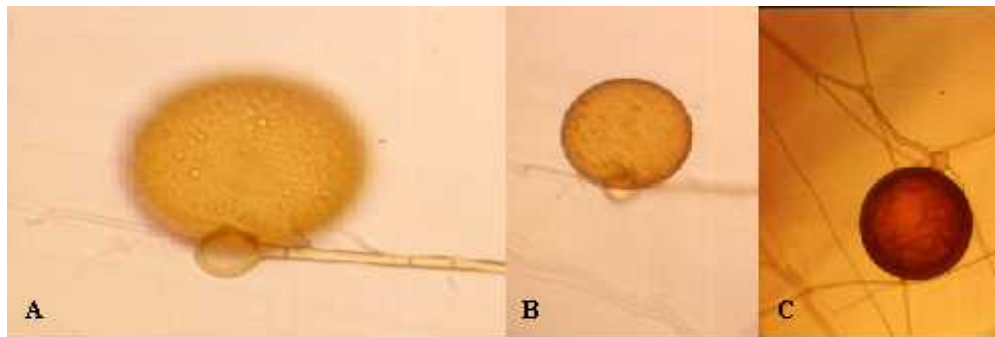


Figura 1. Formação de células auxiliares de *Gigaspora margarita* associada a raízes transformadas de cenoura. A., B. e D. tipo 1; C. tipo 2.



**Estádios na formação de esporos de *Scutellospora heterogama*: A) início da formação, observa-se que a parede externa pouco mais clara e pontos brilhantes indicando acumulo de lipídeos; B) Estádio seguinte, observa-se maior escurecimento e definição da parede externa; C) Esporo maduro.**

Figura 2. Formação de esporo e célula auxiliar de *Scutellospora heterogama* associado a raízes transformadas de trevo. A. e B. observe a formação da parede ornamentada. C. Esporo maduro. D. Célula auxiliar.

Tabela 3. Composição dos diferentes meios: NO<sub>3</sub> +NH<sub>4</sub>, NO<sub>3</sub>, citrato e uréia.

Componentes	Concentrações mg/l			
	NO <sub>3</sub> +NH <sub>4</sub>	NO <sub>3</sub>	citrato*	uréia*
Macronutrientes:				
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.650			
KNO <sub>3</sub>	1.900	80		
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440			
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	731	731	731
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	4,8	4,8	4,8
KCl		65	72,39	72,39
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O		228		
CaCO <sub>3</sub>			96,58	96,58
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			120,23	120,23
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>7</sub>			308,08	
NH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>				81,68
Micronutrientes:				
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,3			
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6	2,65	2,65	2,65
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	1,5	1,5	1,5
KI	0,83	0,75	0,83	0,83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	0,0024	0,0024	0,0024
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,13	0,13	0,13
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O		6	6	6
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025			
Outros:				
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37,3			
NaFe EDTA		8	8	8
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> 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 NO<sub>3</sub> + NH<sub>4</sub> constitui o meio Murashige & Skoog – MS. De um modo geral, todos os meios restantes foram formulados a partir do meio mínimo – MM (NO<sub>3</sub>) com algumas modificações . O pH 5,8 foi ajustado para todos os meios.

Durante o período foi realizado 66.6% do programado para a meta 1 e 75% do programado para a meta 2. A principal dificuldade encontrada está sendo a obtenção de esporos livres de contaminantes e que apresentem germinação após o processo desinfestação. Isto impediu o início de culturas a partir de esporos de três espécies de *Acaulospora* (*A. morrowiae*, *A. scrobiculata* e

*A. tuberculata*). Isto demonstra também um certo grau de desconhecimento com relação à aspectos básicos destes fungos. Há relatos na literatura de que algumas espécies de *Acaulospora* tais como *A. laevis* apresentam um período de dormência superior a seis meses, mas não há relatos sobre a germinação in vitro de espécies deste gênero.

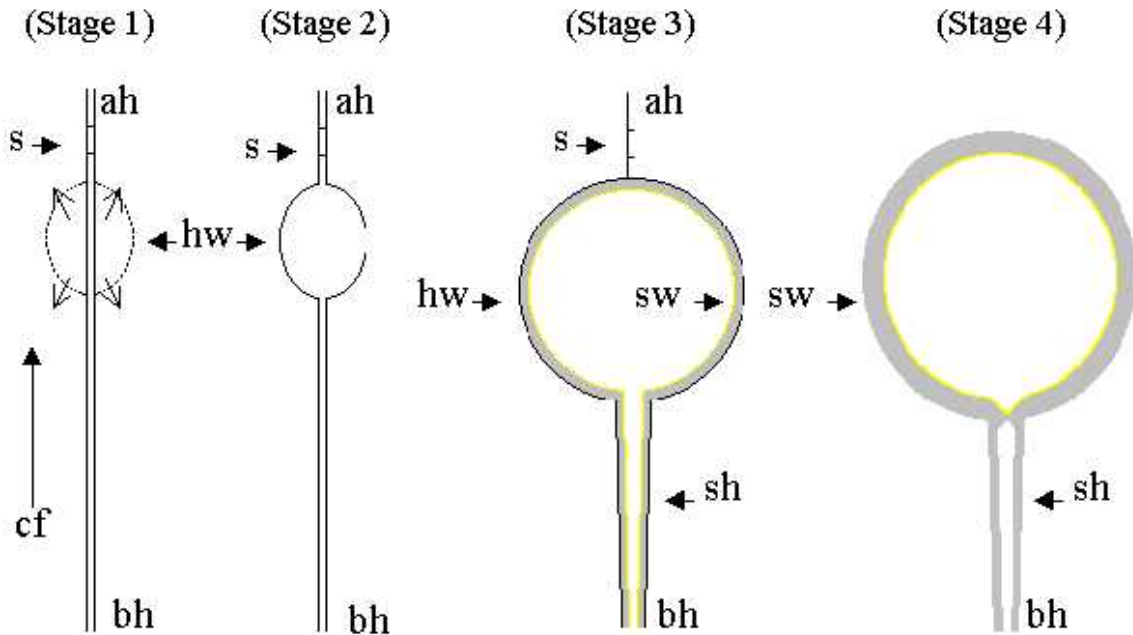


Figura 3. Representação esquemática da ontogenia de esporos de *Glomus clarum*. Estágio 1. Note a formação de septos (s) na parte apical da hifa (ah) esporogênica. O fluxo citoplasmático (cf) contínuo através da hifa basal (bh) permite que o esporo se desenvolva. A linha pontilhada mostra onde a parede da hifa (hw) irá entumescer. Estágio 2. Observe o entumescimento da hifa esporogênica. Nesta fase somente a parede da hifa está presente. Estágio 3. Nesta fase a parede do esporo (sw) e da hifa de sustentação (sh) são sintetizadas na parte interna a partir da hifa de esporogênica. Estágio 4. Esporo maduro, sem a parede da hifa.

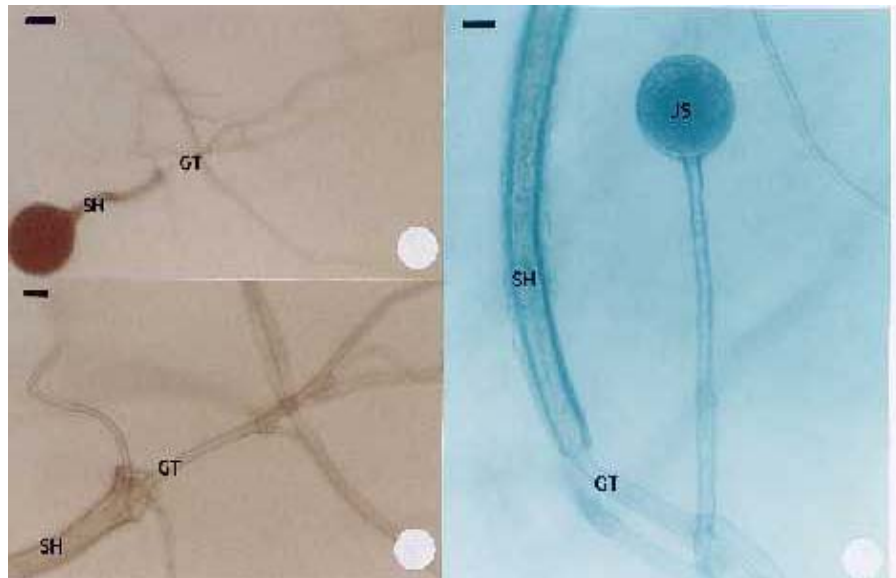


Figura 4. A.) Esporo de *Glomus clarum* germinando em agár-água. Bar = 50 $\mu$ m; B.) Detalhe do tubo germinativo (GT) surgindo do interior da hifa de sustentação (SH). Bar = 10 $\mu$ m; C.) Formação de espora juvenil (JS) a partir de um espora germinado crescendo axenicamente. Bar = 10 $\mu$ m.

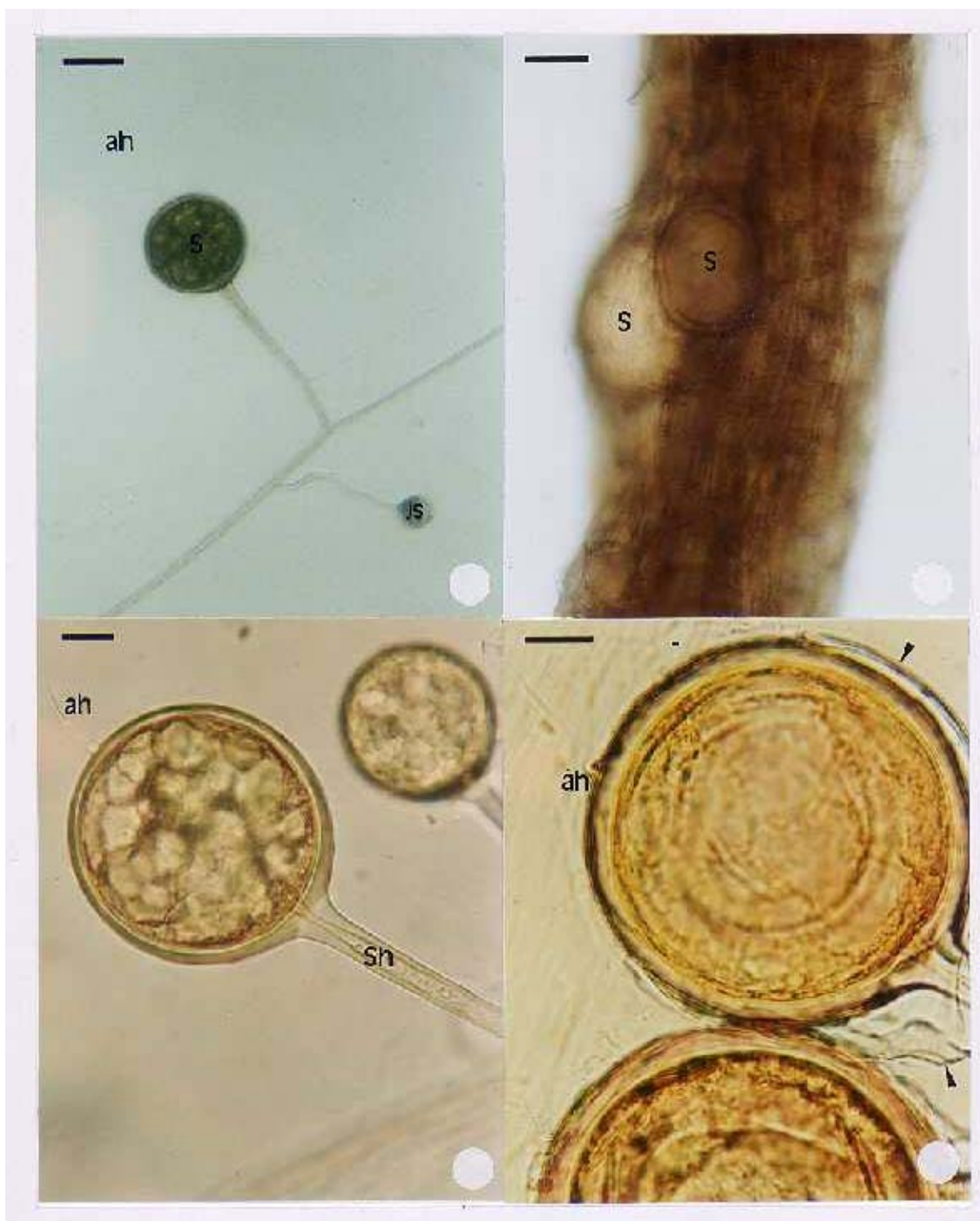


Figura 5. Desenvolvimento de esporo de *Glomus clarum* a partir da hifa principal. A) Formação intercalar de esporo (S) e esporo juvenil (JS). Bar = 50 $\mu$ m; B). Formação de esporos no interior de raízes. Bar = 5 $\mu$ m; C). Hifa apical (ah) de um esporo crescendo em placas de petri com meio ágar. Note a integridade da hifa apical. Bar = 10 $\mu$ m); D). A ah em esporos crescendo em meio líquido associado a raízes transformadas de *Trifolium*. Note que a ah ainda permanece conectada ao esporo em desenvolvimento. A parede da hifa esporogênica se desprende da parede do esporo. PVLG + Melzer 1:1 (cabeças de setas). Bar = 20 $\mu$ m.

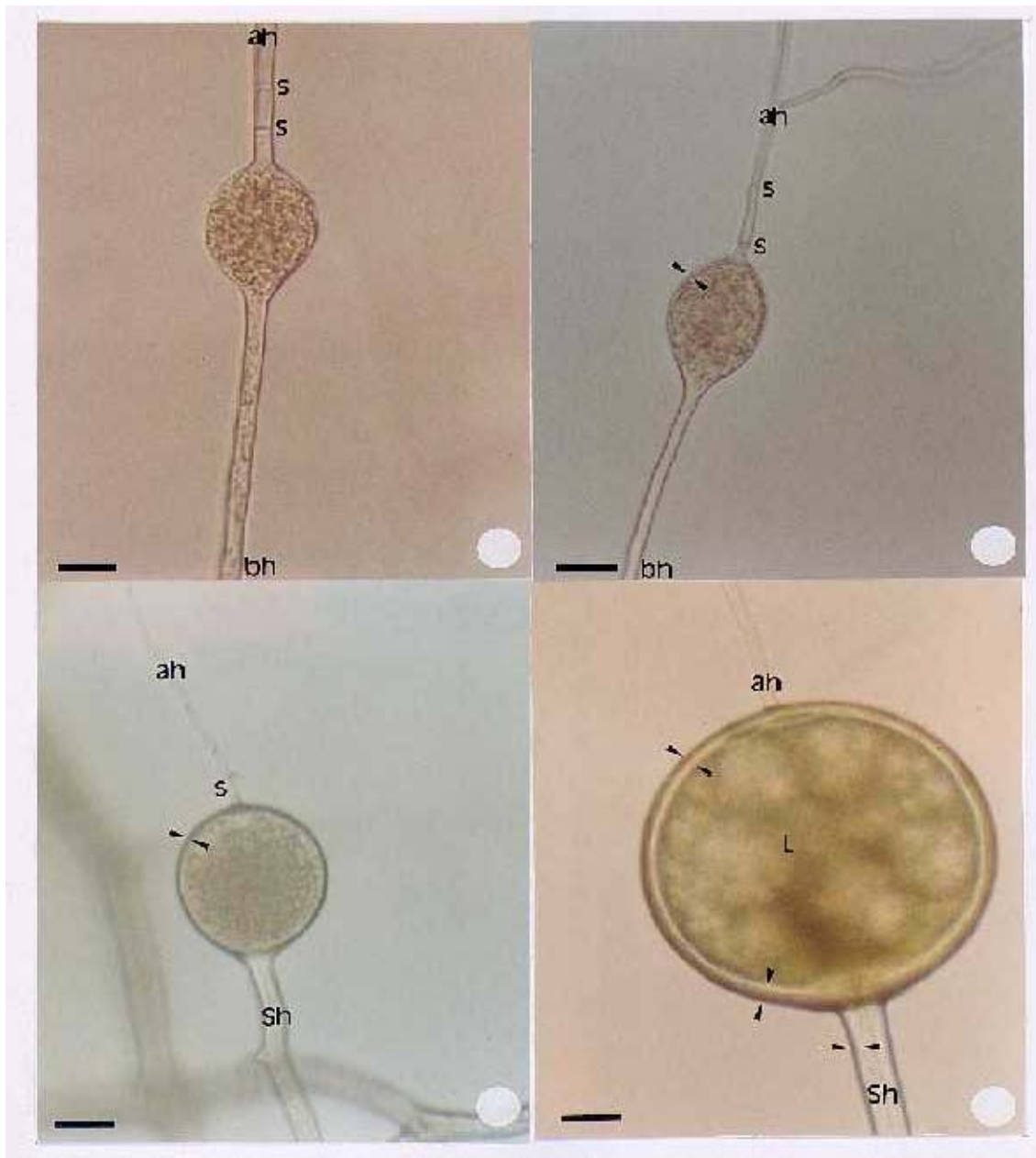


Figura 6. Esporogênese de *Glomus clarum* em raízes transformadas de trevo, crescidas em placas de petri. Formação intercalar dos esporos. A. Início da formação do esporo a partir da hifa esporogênica. Observa-se a presença de septos (s) na posição apical (ah) e o entumescimento da hifa e a presença de denso citoplasma na parte basal da hifa (bh). Nesta fase somente a parede da hifa está presente. B. Início da formação da parede do esporo no interior da hifa esporogênica (entre setas). C. Estágio seguinte da formação da parede do esporo e da hifa de sustentação. D. Acumulação de lipídeos e espessamento da parede (barras = 20  $\mu\text{m}$ ).

Com o objetivo de melhor caracterização do metabolismo das raízes transformadas e suas relações com processos simbióticos associados a colonização e esporulação de *Glomus clarum*, foram avaliadas: novas composições de meio de cultura suplementados com diferentes formas de nitrogênio, a atividade de proteases e de enzimas ligadas ao metabolismo do nitrogênio (Nitrato Redutase "NR" e Glutamina Sintetase "GS"). E foram determinados também N-amino, açúcares solúveis, nitrato e amônio, bem como as taxas de crescimento das raízes e a esporulação. Este estudo foi desenvolvido no laboratório de Biologia do Solo pertencente ao Departamento de Solos da UFRRJ.

1- Entre os quatro meios utilizados, os com  $\text{NO}_3 + \text{NH}_4$  ou  $\text{NO}_3$ , foram os que mais favoreceram o crescimento das duas espécies de raízes transgênicas;

2- As concentrações de N-amino foram baixas nas raízes de cenoura e de trevo, quando desenvolvidas no meio com apenas  $\text{NO}_3$  como fonte de N. Provavelmente, o  $\text{NO}_3$  foi acumulado no vacúolo (resultados ainda estão sendo analisados);

3- As raízes desenvolvidas nos meios com  $\text{NO}_3 + \text{NH}_4$  e  $\text{NO}_3$ , apresentaram os menores teores de açúcares solúveis, sendo que, nas raízes de trevo, esses valores foram ainda mais inferiores;

4- Não foi observada atividade das enzimas Nitrato Redutase (NR) e Glutamina Sintetase (GS), nas duas espécies de raízes cultivadas nos quatro meios de cultura, com as diferentes fontes de N;

5- A atividade da protease, nas raízes de cenoura e de trevo desenvolvidas nos meios com diferentes fontes de N, de um modo geral, apresentaram maior atividade aos 60 minutos e aos 120 minutos, a atividade já havia estabilizado. Entretanto, a atividade da protease nas raízes desenvolvidas no meio com  $\text{NO}_3 + \text{NH}_4$ , no período de 120 minutos ainda estava em crescimento.

Figuras e tabelas contendo estes dados estão em preparação.

Tabela 4. Concentração dos nutrientes utilizados na formulação dos meios.

Nutrientes	NO <sub>3</sub> + NH <sub>4</sub> (mM)	NO <sub>3</sub> (mM)	Citrato (mM)	Uréia (mM)
N	39,405	2,720	2,720	2,720
P	1,249	0,035	0,035	0,035
K	20,045	1,701	2,391	2,391
Mg	1,501	2,965	2,965	2,965
S	1,728	2,975	3,665	3,665
Mn	0,099	0,030	0,030	0,030
Ca	2,994	0,965	0,965	0,965
Cl	5,987	0,9326	1,0316	1,0316
I	0,005	0,004	0,005	0,005
Zn	0,029	0,009	0,009	0,009
B	0,100	0,024	0,024	0,024
Cu	0,1x10 <sup>-3</sup>	0,5x10 <sup>-3</sup>	0,005	0,005
Mo	0,001	0,9x10 <sup>-5</sup>	0,9x10 <sup>-5</sup>	0,9x10 <sup>-5</sup>
Fe	0,099	0,0216	0,0216	0,0216
Na	0,102	0,021	0,021	0,021
Co	0,1x10 <sup>-3</sup>	-	-	-

### 3. Publicações

SOUZA, F.A. de; BERBARA, R.L.L. Ontogeny of *Glomus clarum* in Ri T-DNA transformed roots. Mycologia. New York (Submetido para publicação).

SOUZA, F.A. de; BERBARA, R.L.L. Desenvolvimento de esporos de *Glomus clarum* (Nicolson & Schenck) e raízes Ri T-DNA transformadas. In: Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 26. 5p. Seção Temática 3. 1 CD-Rom. Rio de Janeiro, RJ. 1997.

### 4. Anexos

#### Anexo 1 - Fungos Micorrizicos Empregados no Projeto, que tiveram suas Culturas Renovadas

*Acaulospora scrobiculata* Trappe

*Acaulospora* sp1

*Entrophospora colombiana* Spain & Schenck

*Gigaspora gigantea* (Nicol. & Gerd.) Gerdemann & Trappe

*Gigaspora margarita* Becker & Hall

*Glomus clarum* Nicolson & Schenck



*Glomus manihotis* Howeler, Sieverding & Schenck

*Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann

*Glomus* sp1.

*Scutellospora heterogama* (Nicol. & Gerd) Walker & Sanders

*Scutellospora gregaria* (Schenck & Nicol.) Walker & Sanders

*Scutellospora weresubiae* Koske & Walker

## **Anexo 2 - Material e Métodos (não descritos no corpo do Projeto)**

### **2.1- 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 estatístico utilizado foi inteiramente casualizado, sendo os tratamentos constituídos de um fatorial 4 x 2 (quatro meios de culturas e duas espécies raízes), com três repetições.

Os meios foram formulados com diferentes fontes de nitrogênio:

I) NO<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub>, que representa o meio MS (Murashige & Skoog, 1962);

II) NO<sub>3</sub>, meio Mínimo - MM (Bécard & Piché, 1992, adaptado por Berbara, 1995);

III) Citrato de NH<sub>4</sub>, meio MM modificado e

IV) Uréia - NH<sub>4</sub>, também formulado através do meio MM modificado (Berbara & Fonseca, 1996).

Todos os meios citados foram devidamente preparados e vertidos em placas de Petri (15 cm X 1,5 cm) com capacidade de 55 ml de meio. Um segmento com aproximadamente 2,5 cm de raiz transformada de cenoura (*Daucus carota* L.) ou de trevo (*Trifolium repens*), 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.

### **2.2- DETERMINAÇÕES DO CRESCIMENTO DAS RAÍZES:**

#### **2.2.1- Avaliação do Crescimento das Raízes**

Após a repicagem das raízes, foi efetuada a avaliação do crescimento, de quatro em quatro dias, durante os 28 primeiros dias, através da adaptação de alguns métodos (Tennant, 1975; Bland

& Mesarch, 1990; Farrell et al, 1993; Rossiello et al. 1995) onde se contou a interceptação das raízes em área de 0,5 cm<sup>2</sup>.

As raízes foram cultivadas por um período de 81 dias. O monitoramento do crescimento das raízes foi efetuado apenas nos primeiros 28 dias, devido as duas fontes inorgânicas de N (meio com NO<sub>3</sub> + NH<sub>4</sub> e o meio com apenas o NO<sub>3</sub>) proporcionarem um maior desenvolvimento das raízes durante este período.

### **2.2.2- Determinação do Peso Fresco Total das Raízes**

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

## **2.3- EXTRAÇÃO ALCOÓLICA NO MATERIAL FRESCO**

Após a coleta das raízes, cada amostra foi colocada no almofariz com etanol e homogeneizadas 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 foi adicionado o mesmo volume de clorofôrmio, agitando-se suavemente e deixando-se em repouso por 40 minutos, até a separação das fases polar e apolar.

A fase apolar foi descartada, o volume foi completado para 25 ml com etanol 80% e guardado em geladeira ou temperatura de aproximadamente 6°C, até a realização das análises.

### **2.3.1- Determinações no Extrato Alcoólico**

#### **2.3.1.1- Determinação de N-Amino**

A determinação foi realizada em tubo pirex com 0.5 ml de tampão citrato; 1 ml da solução problema (diluídas quando necessário), adicionado-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. Decorrido esse período, os tubos com as amostras foram colocados para esfriar em água corrente por 5 minutos ou temperatura ambiente, quando então, foi acrescentado 3 ml de etanol 60%, agitando para homogeneizar e efetuou-se a leitura em 570 nm contra o padrão de leucina (Yemm & Cocking, 1955).

### **2.3.1.2- Determinação de Açúcares Solúveis**

Em tubos pirex de 2,5 cm de diâmetro imersos em banho de gelo para resfriar a reação, foi colocado 5 ml do reagente de antrona (4g de antrona em 200ml da solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na proporção 5:2), deixando em repouso por aproximadamente 5 minutos, lentamente foi adicionado de 0.2 a 1.0 ml da solução problema (conforme a concentração da mesma, completando o volume de 1.0 ml com etanol 80%) ou padrão, deixando-se em repouso por 5 minutos em temperatura de 0°C, misturando-se suavemente as amostras foram colocadas em banho-maria a 100°C por 10 minutos para o desenvolvimento da cor verde. Esfriando-se em água corrente e efetuando-se a leitura em 620 nm, contra o padrão de glicose (Yemm & Willis, 1954).

### **2.3.1.3- Determinação Colorimétrica de Nitrato**

Uma alíquota de 0.1 ml da amostra foi pipetada em tubo pirex onde foi vagarosamente adicionado 0.4 ml de da solução de ácido salicílico 5% em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Deixando-se em repouso por 20 minutos em temperatura ambiente, acrescentou-se lentamente 9.5 ml de NaOH 2N e deixou-se esfriar para efetuar-se a leitura em 410nm.

### **2.3.1.4- Determinação de Amônio**

A determinação de N na forma de amônio, foi realizada através do método de arraste de vapor sob MgO. O extrato das raízes, juntamente com água deionizada e óxido de magnésio, foram colocados em balão de Kjeldahl, para... Em seguida, foi recolhido uma alíquota do destilado e acrescentou-se o indicador de ácido bórico. A titulação foi efetuada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.002N.

## **2.4- ANÁLISES DAS ENZIMAS**

### **2.4.1- Atividade da Nitrato Redutase - NRA**

Para a realização da atividade da NR utilizou-se 5 ml de solução incubadora contendo n-propanol 2%, KNO<sub>3</sub> 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. O NO<sub>3</sub> foi utilizado no meio de incubação para se medir a "atividade potencial".

Após a incubação retirou-se para o ensaio 0.4 ml da solução problema, 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 NaNO<sub>3</sub>. Os resultados foram expressos em nmoles de NO<sub>2</sub>/g de peso fresco/hora (Jawroski, 1977 ou 71).

#### **2.4.2- Atividade da Glutamina Sintetase - GS**

Para a extração da enzima, 1g de raízes foi macerada com N<sub>2</sub> por 1 min. Devido as raízes serem muito tenras, não foi necessário tritura-las, acrescentamos apenas 8 ml do tampão de extração (Tris-HCl 0.1M pH 7.8, MgSO<sub>4</sub> 1M e Mercaptoetanol) e homogeneizou-se. Em seguida filtrou-se em gaze, recolhendo o filtrado em um vidro dentro do gelo. Centrifugar logo em seguida por 15 minutos a 0°C a 15000 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 0,5 M, Imidazol ou Tris pH 7.5; 0,1 ml de solução de Mercaptoetanol 0,1 M ou Dithiothreitol 0.1 M; 0,1 ml de solução de MgSO<sub>4</sub> 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<sub>2</sub>O. Todos foram preparados no dia do ensaio com devido controle do pH quando necessário.

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<sub>3</sub>. A leitura foi efetuada em 540 nm, utilizando-se como padrão a gama-glutamil mono-hidroxamato . O controle foi realizado sem o acréscimo de ATP (Farnden & Robertson, 1980).

#### **2.4.3- Atividade das Protease**

Para a determinação da atividade da protease foi utilizada a metodologia de Jones et al. (1995). Imediatamente após a coleta das raízes foi pesado 1g de material, colocada em almofariz acrescentando-se N<sub>2</sub> líquido. Em seguida colocou-se 3ml de Tampão de Extração (EDTA, ácido ascorbico, B-mercaptoetanol, dissolvidos em tampão fosfato 50 mM pH 7,0). Filtrando em quatro camadas de gaze e centrifugado posteriormente (20.000g / 25 minutos). O sobrenadante contendo o extrato de protease foi coletado e deixado em temperatura de 4°C, até o momento do ensaio.

Para a dosagem da protease, colocou-se em tubo de ensaio 1,8 ml de solução de albumina (1 mg/ml - proteína teste, utilizada como substrato para as proteases) 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 (de acordo com alguns ensaios realizados a melhor temperatura foi 30°C para avaliar a atividade da enzima proteolítica).

A reação foi paralisada pelo acréscimo de 1,0 ml do ácido tricloroacético 15%. No tempo zero foi acrescentado o ácido tricloroacético 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 livres pelo ensaio da Ninidrina (Moore & Stein, 1954).

#### **2.4.4- Medida da Quantidade de Proteína**

A quantidade de proteína dos extratos enzimáticos, foi determinada através da metodologia de Bradford (1976). Em tubo pirex foi acrescentado 0.1 ml do extrato protéico mais 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. No preparo do padrão de Albumina, foi utilizado ug Albumina /0.1ml e NaCl 0.15 N.

### **5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- BÉCARD, G.; PICHE, Y. Establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza in root organ culture: review and proposed methodology. **Methods in Microbiology**, New York, v.24, p.89-108, 1992.
- BERBARA, R.L.L. **Ionic fluxes in arbuscular mycorrhizal systems**. Dundee: University of Dundee, 1995. 215p. Tese de doutorado.
- BERBARA, R.L.L.; FONSECA, H.M.A.C. Colonização radicular e esporulação de fungos micorrízicos arbusculares in vitro. In: SIQUEIRA, J.O., ed. **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Lavras: Universidade Federal de Lavras / DCS / DCF, 1996. p.39-66.

- 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**, New York, v.72, p.248-254, 1976.
- FARNDEN, K.J.S.; ROBERTSON, J.G. Methods for studying enzyme involved in metabolism related to nitrogen In: BERGERSEN, F.J., ed. **Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation**. Chichester: John Wiley, 1980. p.265-314.
- 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.
- JAWORSKI, E.G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.43, n.6, p.1274-1279, 1971.
- MOORE, S.; STEIN, W.H. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.211, p. 907-913, 1954.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- 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.
- TENNANT, D. A Test of a modified line intersect method of estimating root length. **Journal of Ecology**, Oxford, v.63, p.995-1001, 1975.
- YEMM, E.W.; WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrate in plants extracts by anthrone. **Biochemistry**, Washington, v.57, p.508-514, 1954.
- YEMM, E.W.; COCKING, E.C. The determination of Aminoacid with Ninhydrin. **Analyst**, London, v.80, p.209-213, 1955.