

Documentos

ISSN 0104-6187

Novembro, 1998

Número, 63



**Estudos Básicos sobre Colonização e Esporulação de Fungos
Micorrízicos Arbusculares(FMA) em Raízes Transgênicas
Relacionados com Outros Organismos e Desenvolvimento de
Técnicas Imunológicas**



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Agrobiologia
Ministério da Agricultura e do Abastecimento

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 Nº63

ISSN 0104-6187

Novembro 1998

**Estudos Básicos sobre Colonização e Esporulação de Fungos
Micorrízicos Arbusculares(FMA) em Raízes Transgênicas
Relacionados com Outros Organismos e Desenvolvimento de
Técnicas Imunológicas**

Francisco Adriano de Souza
Ricardo Luiz Louro Berbara
Verônica Massena Reis

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: sac@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.; REIS, V.M. **Estudos básicos sobre colonização e esporulação de fungos micorrízicos arbusculares(FMA) em raízes transgênicas relacionados com outros organismos e desenvolvimento de técnicas imunológicas.** Seropédica: Embrapa *Agrobiologia*, nov. 1998. 20p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 63).

ISSN 0104-6187

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

CDD 589.2

SUMÁRIO

1. RESUMO	4
2. RESULTADOS PARCIAIS	5
3. DIFUSÃO E VALIDAÇÃO DE RESULTADOS	11
4. PUBLICAÇÕES.....	12
5. ALTERAÇÕES NA FORMULAÇÃO	12
6. SUBPROJETOS VINCULADOS	13
7. ANEXO	14
7.1. ANEXO 1 - FUNGOS MICORRÍZICOS EMPREGADOS NO PROJETO, QUE TIVERAM SUAS CULTURAS RENOVADAS	14
7.2. ANEXO 2 - MATERIAL E MÉTODOS (NÃO DESCRITOS NO CORPO DO PROJETO)	14
7.2.1. <i>Desenvolvimento do trabalho</i>	14
7.2.2. <i>Determinações do crescimento das raízes:</i>	15
7.2.2.1. <i>Avaliação do Crescimento das Raízes</i>	15
7.2.2.2. <i>Determinação do Peso Fresco Total das Raízes</i>	15
7.2.3. <i>Extração alcoólica no material fresco</i>	15
7.2.3.1. <i>Determinações no Extrato Alcoólico</i>	16
7.2.3.1.1. <i>Determinação de N-Amino</i>	16
7.2.3.1.2. <i>Determinação de Açúcares Solúveis</i>	16
7.2.3.1.3. <i>Determinação Colorimétrica de Nitrato</i>	16
7.2.3.1.4. <i>Determinação de Amônio</i>	17
7.2.4. <i>Análises das enzimas</i>	17
7.2.4.1 <i>Atividade da Nitrato Redutase - NRA</i>	17
7.2.4.2. <i>Atividade da Glutamina Sintetase - GS</i>	17
7.2.4.3. <i>Atividade das Protease</i>	18
7.2.4.4. <i>Medida da Quantidade de Proteína</i>	18
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

Estudos Básicos sobre Colonização e Esporulação de Fungos Micorrízicos Arbusculares(FMA) em Raízes Transgênicas Relacionados com Outros Organismos e Desenvolvimento de Técnicas Imunológicas¹

Francisco Adriano de Souza²
Ricardo Luiz Louro Berbara³
Verônica Massena Reis²

1. Resumo

Os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) são essenciais para o crescimento e a produção de diversas espécies de plantas. 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. Este projeto tem por objetivos desenvolver estudos básicos sobre a colonização e esporulação de FMAs e o desenvolvimento de técnicas de sorologia para identificação de FMAs a partir de raízes colonizadas. 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*, as demais, em simbiose com raízes transformadas 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 gênero *Glomus*. 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 (Nitrato Redutase "NR" e Glutamina Sintetase "GS"). E

¹ O trabalho refere-se ao relatório anual (1997) do projeto 03.0.96.123, com o mesmo título.

² Pesquisador da Embrapa Agrobiologia, Caixa Postal 74505, Cep 23851-970, Seropédica - RJ.

³ Professor Adjunto do Departamento de Solos da UFRRJ.

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. O subprojeto 03 que trata do desenvolvimento de soros policlonais para detecção de FMAs, atingiu 50% do proposto como meta com o desenvolvimento de um soro policlonal contra material de *Gigaspora margarita*, este apresentou reações imunológicas elevadas contra os esporos, decrescendo respectivamente, para micélio e raízes colonizadas, na concentração de 5,0 e 2,5 mg de raízes / 50µl de solução e apresentou baixa reação cruzada quando testado contra esporos de outras famílias de FMAs. A detecção de material de raízes colonizadas pelo fungo possibilitará o cumprimento da meta 06, prevista para o próximo ano. Esta consiste na avaliação da colonização radicular através de ELISA indireto. A meta 05, que consiste na otimização da técnica do imuno-ouro para o estudo da ontogenia e competitividade entre espécies de FMAs a partir dos soros policlonais obtidos, também prevista para o próximo ano poderá ser executada com o soro obtido. Foram incluídas alterações na formulação do projeto.

2. Resultados Parciais

SUBPROJETO 01

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 seguida 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 *Gigaspora gigantea* chegou a completar seu ciclo, formando um único esporo quando em simbiose com raízes transformadas de trevo. A formação de novos esporos foi comprometida devido a 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 (objetos 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 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.

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 de 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.

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 estudadas novas composições de meio de cultura suplementados com diferentes formas de nitrogênio e feitas as seguintes avaliações: a atividade de proteases e de enzimas ligadas ao metabolismo do nitrogênio (Redutase do Nitrato "RN" 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 NO_3 , foram os que mais favoreceram o crescimento das duas espécies de raízes transgênicas, proporcionando melhores resultados do que os meios com uréia e citrato;

2- As concentrações de N-amino foram baixas nas raízes de cenoura e de trevo, quando desenvolvidas no meio com apenas NO_3 como fonte de N. Provavelmente, o 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 NO_3 , apresentaram os menores teores de açúcares solúveis, sendo que, nas raízes de trevo, esses valores foram ainda menores;

4- Não foi observado atividade das enzimas Redutase do Nitrato (RN) 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 NO₃ + NH₄, no período de 120 minutos ainda estava em crescimento.

SUBPROJETO 03

Na primeira fase do trabalho foi desenvolvido soro policlonal a partir da parede de esporos de três espécies (*Gigaspora margarita*, *Glomus clarum* e *Scutellospora heterogama*). Estes soros quando testados em ELISA indireto não apresentaram boa reatividade.

Na segunda fase, optou-se pela imunização dos animais a partir de extratos de proteínas solúveis originárias de esporos. Assim, foi desenvolvido soro policlonal a partir de proteínas solúveis de esporos de *Gigaspora margarita*. O soro sem purificação (bruto) apresentou reações imunológicas até a diluição do antígeno de 1:3000 vezes, sendo que o ótimo ficou na faixa de 1:500 vezes (objeto 8). Após a purificação através da passagem do soro bruto por coluna preenchida com Proteína "A" (Merk), ocorrem perdas de imunoglobulinas não específicas (IgM principalmente) diminuindo as reações imunológicas mas ganhando em especificidade. Após este tratamento, o título máximo ficou em torno da diluição de 1:1000, sendo o ótimo a diluição 1:100 vezes.

A especificidade do anticorpo foi determinada através do teste de reação cruzada contra esporos de outros FMAs tais como: *Glomus clarum*, *G. etunicatum*, *Scutellospora gregaria* e *S. heterogama*, sendo que *S. gregaria* apresentou certa reação por ser da mesma família de *G. margarita* (Tabela 1). Outros FMA nativos ou mesmo outros componentes da microbiota serão testados visando quantificar as reações cruzadas em amostras naturais (plantas e solo).

Tabela 1. Teste preliminar de quantificação de reações cruzadas em ELISA indireto de soro policlonal obtido a partir de proteínas solúveis extraídas a partir de esporos de *Gigaspora margarita*: As leituras da placa de ELISA foram feitas a 405 nm.

ESPÉCIE FMA	Nº de esporos/poço	Anticorpo Bruto
<i>Gigaspora margarita</i>	30	1,320
<i>Glomus clarum</i>	30	0,027
	60	0,015
<i>Glomus etunicatum</i>	30	0,012
	60	0,031
<i>Scutellospora gregaria</i>	30	0,124
<i>Scutellospora heterogama</i>	30	0,062

O anticorpo também foi aplicado contra esporos de *Gigaspora margarita*, além de micélio e raízes transformadas e colonizadas pelo mesmo fungo (Tabela 2). O anticorpo apresentou reações imunológicas elevadas contra os esporos, decrescendo respectivamente, para micélio e raízes colonizadas, na concentração de 5,0 e 2,5 mg de raízes/50µl de solução.

Tabela 2. Sensibilidade pelo método de ELISA indireto contra estruturas do FMA e raízes transformadas de cenoura, colonizadas ou não com o FMA *Gigaspora margarita*. As leituras da placa de ELISA foram feitas a 405 nm.

Material	Quantidade/poço	Leituras
Esporos	30 esporos	0,835
Micélio	*	0,174
Raízes colonizadas	2,5 mg	0,154
	5,0 mg	0,148
Raízes não colonizadas	2,5 mg	0,069
	5,0 mg	0,086

(*) Quantidade de micélio não determinada.

Estes resultados representam 50% do proposto para o atingimento da meta. A obtenção do segundo soro proposto esta atrasada, ele será obtido a partir de proteínas solúveis de esporos de *Glomus clarum*, porém ainda esta na fase da imunização dos animais. O atraso ocorreu devido a grande quantidade de esporos necessários para extração do teor de proteína necessário à imunização dos coelhos. O teor de proteína mínimo necessário em cada imunização para coelhos Nova Zelândia deve estar na faixa de 50 a 1000 mg. Neste sentido foram extraídos e separados manualmente mais de 50.000 esporos, estes foram liofilizados e o peso seco determinado. Após extração de proteínas solúveis o extrato obtido foi homogeneizado e em seguida alicotado e armazenado a -20°C. O extrato apresentou 37 mg.ml⁻¹ de proteína, determinado através do método do BRADFORD.

Tabela 3. Composição dos diferentes meios: NO₃ +NH₄, NO₃, citrato e uréia.

Componentes	Concentrações mg/l			
	NO ₃ +NH ₄	NO ₃	citrato*	uréia*
Macronutrientes:				
NH ₄ NO ₃	1.650			
KNO ₃	1.900	80		
CaCl ₂ .2H ₂ O	440			
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	731	731	731
KH ₂ PO ₄	170	4,8	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	22,3			
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	2,65	2,65	2,65
H ₃ BO ₃	6,2	1,5	1,5	1,5
KI	0,83	0,75	0,83	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,0024	0,0024	0,0024
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,13	0,13	0,13
MnCl ₂ .4H ₂ O		6	6	6
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.

Os resultados apresentados mostram, através do método de ELISA indireto a possibilidade de produzir um anticorpo policlonal espécie-específico a partir de proteínas solúveis extraídas de esporos do FMA *Gigaspora margarita*. A detecção de material de raízes colonizadas pelo fungo possibilitará o cumprimento da meta 02, prevista para o próximo ano. Esta consiste na avaliação da colonização radicular através de ELISA indireto. A meta 03, que consiste na otimização da

técnica do imuno-ouro para o estudo da ontogenia e competitividade entre espécies de FMAs a partir dos soros policlonais obtidos, também prevista para o próximo ano poderá ser executada com o soro obtido.

Tabela 4. Concentração dos nutrientes utilizados na formulação dos meios

Nutrientes	NO ₃ + NH ₄ (mM)	NO ₃ (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 ⁻³	0,5x10 ⁻³	0,005	0,005
Mo	0,001	0,9x10 ⁻⁵	0,9x10 ⁻⁵	0,9x10 ⁻⁵
Fe	0,099	0,0216	0,0216	0,0216
Na	0,102	0,021	0,021	0,021
Co	0,1x10 ⁻³	-	-	-

3. Difusão e Validação de Resultados

Curso de Taxonomia de Glomales

Coordenador: Francisco A. de Souza (Embrapa Agrobiologia)

Docentes: Sandra F.B. Trufem (Instituto de Botânica - SP) e Rosilaine Carengo (Instituto de Botânica - SP)

Palestrante: Norma Gouvea Runjanek (Embrapa Agrobiologia)

Público: Estudantes de Pós-Graduação (UFRRJ e Estadual de Maringá) e professores universitários. Carga horária 45 horas (15 teórica e 30 prática), correspondendo a 02 créditos de carga horária.

Período: 18 a 22 de Agosto de 1997

4. Publicações

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

DE SOUZA, F.A.; 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.

5. Alterações na Formulação

Será ajustada metodologia para desinfestação de fragmentos de raízes colonizadas por FMAs provenientes de vasos de cultivo do fungo. Este procedimento visa a obtenção de propágulos infectivos livres de contaminantes e que apresentem germinação em meio-de-cultura. Com este procedimento a introdução de espécies de FMAs que apresentem esporos com difícil germinação *in vitro* poderá ser sanado. Este procedimento auxiliará no cumprimento da meta 01.

Será ajustada metodologia para solubilização do Geo-GRO (ágar substituto) utilizado no meio-de-cultura para crescimento da cultura monoxênica. Este procedimento visa melhorar a extração das raízes colonizadas e do micélio obtido durante a crescimento *in vitro*. O ajuste deste protocolo, permitirá uma melhor quantificação do material produzido e extração de esporos e do micélio.

Ajuste do programa SIARCS de análise de imagens para quantificação do desenvolvimento do micélio *in vivo*.

Serão obtidas raízes Ri T-DNA transformadas a partir de plantas de batata-doce (*Iponea batatas*) cultivar Rosinha de Verdã e mandioca (*Manihot esculenta*) cultivar Saracura. Neste sentido foram obtidos dois isolados de *Agrobacterium rhizogenes* através da Fundação André Tosello. As raízes transformadas de Batata-doce serão utilizadas na obtenção de raízes verdes. E as de mandioca no cultivo tradicional do fungo. Estas espécies foram escolhidas devido a alta

dependência micorrízica destas plantas e no caso da batata-doce devido a facilidade de produção de clorofila nos tecidos radiculares em plântulas de cultura de tecido da cultivar citada.

Desenvolver protocolos objetivando a produção por períodos de tempo mais longos (4-6 meses) de raízes transgênicas autotróficas.

Será feita a caracterização dos atígenos utilizados na imunização dos animais. O extrato bruto de proteína solúvel obtido a partir dos esporos serão utilizados para obtenção de gel de poliacrilamida e posteriormente incubado com o soro a fim se conhecer as proteínas imunogênicas (DOT-BLOT). Este trabalho será desenvolvido com os fungos *Gigaspora margarita* e *Glomus clarum*. A fim de atender a meta 05 e a 06, será conduzido em condições de casa-de-vegetação um experimento envolvendo os fungos *Gigaspora margarita* e *Glomus clarum*, a fim de se quantificar a colonização radicular a através de ELISA indireto e a presença de estruturas do fungo através da técnica do imuno-ouro. O delineamento experimental será o de blocos casualizados com quatro repetições em esquema fatorial. Os fatores serão fungo (04 níveis: controle, *Gigaspora margarita*, *Glomus clarum* e mistura dos fungos), doses de fósforo (02 níveis: baixo e alto), planta hospedeira (sorgo e batata-doce) e duas épocas de avaliação, perfazendo um total de 128 parcelas experimentais (vasos).

Mudanças na Equipe

José Eduardo Neves (Entrou para a Equipe em 1997)

CPF: 041490997 66

Graduando em Biologia - UFRRJ Bolsista CNPq/PIBIC.

6. Subprojetos Vinculados

03.0.96.123.01 - Estudo da ontogenia da colonização e esporulação de fungos micorrízicos arbusculares (MA) em raízes transgênicas de *Trifolium repens* L. e *Daucus carota* L.

03.0.96.123.03 - Desenvolvimento de técnicas imunológicas aplicadas na detecção específica de fungos micorrízicos arbusculares

7. Anexo

7.1. Anexo 1 - Fungos micorrízicos 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

7.2. Anexo 2 - Material e métodos (não descritos no corpo do projeto)

7.2.1. 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_3 e NH_4 , que representa o meio MS (Murashige & Skoog, 1962);

II) NO_3 , meio Mínimo - MM (Bécard & Piché, 1992, adaptado por Berbara, 1995);

III) Citrato de NH_4 , meio MM modificado e

IV) Uréia - NH_4^+ , 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.

7.2.2. Determinações do crescimento das raízes:

7.2.2.1. 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 cm².

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 NO₃ + NH₄ e o meio com apenas o NO₃) proporcionarem um maior desenvolvimento das raízes durante este período.

7.2.2.2. 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.

7.2.3. 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.

7.2.3.1. Determinações no Extrato Alcoólico

7.2.3.1.1. 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 1,2 ml 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).

7.2.3.1.2. 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 200 ml da solução de H₂SO₄ 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).

7.2.3.1.3. 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 H₂SO₄ 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.

7.2.3.1.4. 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 ataque com NaOH e posterior destilação. Em seguida, foi recolhido uma alíquota do destilado e acrescentou-se o indicador de ácido bórico. A titulação foi efetuada com H₂SO₄ 0,002N.

7.2.4. Análises das enzimas

7.2.4.1 Atividade da Nitrato Redutase - NRA

Para a realização da atividade da NR utilizou-se 5 ml de solução incubadora contendo n-propanol 2%, 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. O NO₃ 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 NaNO₃. Os resultados foram expressos em nmoles de NO₂/g de peso fresco/hora (Jawroski, 1977 ou 71).

7.2.4.2. Atividade da Glutamina Sintetase - GS

Para a extração da enzima, 1g de raízes foi macerada com N₂ por 1 min. Devido as raízes serem muito tenras, não foi necessário triturá-las, acrescentamos apenas 8 ml do tampão de extração (Tris-HCl 0,1M pH 7,8, MgSO₄ 1M e Mercaptoetanol) e homogeneizou-se. Em seguida filtrou-se em gaze, recolhendo o filtrado em um vidro dentro do gelo. Centrifugou-se 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 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 H₂O. 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 FeCl₃. 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 e Robertson, 1980).

7.2.4.3. 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 N₂ 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).

7.2.4.4. 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.

8. Referências Bibliográficas

- BÉCARD, G.; PICHÉ, Y. Establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza in root organ culture: review and proposed methodology. **Methods in Microbiology**, v.24, 1992. p.89-108.
- 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**, San Diego, v.72, p.248-254, 1976.
- FARNDEN, K.J.S.; ROBERTSON, J.G. Methods for studying enzymes involved in metabolism related to nitrogenase. In: BERGERSEN, F.J., ed. **Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation**. Chichester: John Wiley & Sons, 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**, San Diego, v.43, 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**, Bethesda, 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.; COCKING, E.C. The determination of Aminoacid with Ninhydrin. **Analist**, v.80, p.209-213, 1955.

YEMM, E.W. & WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrate in plants extracts by anthrone. **Biochemistry**, Washington, v.57, p.508-514, 1954.