

ADALBERTO ANTÔNIO SUKUMULA CHIQUETE

**ATIVIDADES DAS ENZIMAS DE ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO EM
MUDAS DE EUCALIPTO COM ECTOMICORRÍZAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de "Magister Scientiae"

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2001**

ADALBERTO ANTÔNIO SUKUMULA CHIQUETE

ATIVIDADES DAS ENZIMAS DE ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO EM MUDAS DE EUCALIPTO COM ECTOMICORRÍZAS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de "Magister Scientiae"

APROVADA: 09 de outubro de 2001

Prof. Arnaldo Chaer Borges
(Conselheiro)

Prof. Paulo Roberto Gomes Pereira
(Conselheiro)

Dr. Raymond Pacovsky

Prof. Júlio César Lima Neves

Prof^ª Maria Catarina Megumi Kasuya
(Orientadora)

A DEUS, que excede todo o entendimento.

Aos meus pais, Sebastião e Ilda.

Aos meus irmãos, Florindo e Pedro.

Às minhas irmãs, Josefa e Dorotéia.

Dedico.

AGRADECIMENTO

À Deus, pela presença marcante e insubstituível em cada instante da minha vida.

Aos meus pais, pela vida, pelo amor e pela dedicação que tornaram possível minha formação.

Aos meus Irmãos, pelo carinho, amizade, companheirismo e incentivo.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos realizando este programa.

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa de Estudante Convênio Brasil - Angola (PEC-PG), pela bolsa de estudos concedida.

Ao CNPq pelas bolsas de Iniciação Científica que me permitiram descobrir os caminhos da pesquisa.

À professora Maria Catarina Megumi Kasuya, que soube como ninguém, ser muito mais que apenas mestre, profissional ou amiga, transmitindo contínuas lições de vida e de humildade.

Aos professores Arnaldo Chaer Borges e Paulo Roberto Gomes Pereira pelo auxílio durante a realização deste trabalho.

Ao professor Júlio César Lima Neves, pela disponibilidade e auxílio na análise de dados.

Ao professor Daison Olzany Silva, pela amizade e pelo incentivo.

Aos demais professores do Departamento de Microbiologia pelo conhecimento transmitido.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, Danilo, Evandro, José Reinaldo, Paulo, Antônio, Raimundo, Nilcéa, Laura e Aparecida pelos serviços prestados.

Ao Marlon e à Carol, pela amizade e auxílio nas análises.

À Igreja Presbiteriana de Viçosa, que me acolheu durante todos estes anos, pelo incentivo e amizade.

Ao Maurício pelas boas idéias, orientação, incentivo e amizade.

Aos amigos Adão, Olinto, Jorge, Jildete, Francilina, Guilherme, Kerley, Rodrigo e Ximena pelos momentos de alegria e descontração.

Aos colegas e amigos do laboratório de Micorrizas: Adriano, André, Ávila, Carlos, Chelen, Daniele, Fausto, Galvão, Gilmara, Henrique, Lydice, Manuela, Marcelo, e Selma pela paciência, amizade e companheirismo.

Aos colegas e amigos do curso pelos estudos em grupos e pelo agradável convívio.

A toda a família CHIQUETE pelo incentivo, confiança e carinho.

À Família DOCHE, que prontamente me recebeu como filho durante todos estes anos.

A todos os amigos e companheiros do CEM, pelo carinho, consolo e incentivo que contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

ADALBERTO ANTÔNIO SUKUMULA CHIQUETE, filho de Sebastião Chiquete e Ilda Helena dos Santos Chiquete, nasceu na República Popular de Angola, na cidade da Ganda, Província de Benguela, no dia 11 de junho de 1976.

Iniciou os estudos básicos na Província da Huila, Município do Lubango, terminando-os no Brasil, na cidade de Belo Horizonte, MG.

No ano de 1994 iniciou o curso de graduação em Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em agosto de 1999.

Em setembro de 1999 iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa-MG, concentrando seus estudos na área de Microbiologia do Solo.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO.....1	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Importância, utilização e contribuição de fungos micorrízicos na nutrição nitrogenada das plantas.....	2
2.2. Assimilação de nitrogênio.....	3
2.3. Efeito do nitrogênio e micorrizas na produção florestal.....	8
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1. Atividade enzimática no micélio.....	10
3.1.1. Crescimento micelial.....	10
3.1.2. Extrato micelial.....	10
3.1.3. Proteína total.....	11

3.1.4. Atividade da glutamato desidrogenase (GDH).....	11
3.1.5. Atividade da glutamina sintetase (GS).....	12
3.1.6. Atividade da glutamato sintase (GOGAT).....	12
3.2. Atividade enzimática na planta.....	13
3.2.1. Obtenção do inoculo.....	13
3.2.2. Obtenção das plantas.....	13
3.2.3. Transplântio e inoculação.....	13
3.2.4. Colonização micorrízica.....	14
3.2.5. Atividade da redutase do nitrato (RN) (E.C.1.6.6.1) na parte aérea e no sistema radicular de mudas de <i>Eucalyptus</i> <i>grandis</i>	14
3.2.6. Extrato de planta.....	15
3.2.7. Atividade da glutamina sintetase(GS) (E.C.6.3.1.2) na parte aérea e sistema radicular de mudas de <i>E.</i> <i>grandis</i>	15
3.2.8. Atividade da glutamato desidrogenase (GDH) na parte aérea e sistema radicular de mudas de <i>E. grandis</i>	16
3.2.9. Atividade da glutamato sintase (GOGAT) na parte aérea e sistema radicular de mudas de <i>E. grandis</i>	16
3.2.10. Matéria seca e composição nutricional.....	16
3.2.11. Análises estatísticas.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
4.1. Atividade das enzimas do nitrogênio no micélio.....	18
4.2. Proteínas na planta.....	21
4.3. Atividade da nitrato redutase na planta.....	24
4.4. Atividade de GDH, GS e GOGAT na planta.....	26
4.5. Colonização micorrízica e produção de matéria seca na planta.....	31
4.6. Composição mineral das plantas.....	35
CONCLUSÕES.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

RESUMO

CHIQUETE, Adalberto Antônio Sukumula, MS., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2001. **Atividades das enzimas de assimilação de nitrogênio em mudas de eucalipto com ectomicorrizas.** Orientadora: Maria Catarina Megumi Kasuya. Conselheiros: Arnaldo Chaer Borges e Paulo Roberto Gomes Pereira.

A atividade de glutamato desidrogenase (GDH), glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) foi determinada em três isolados dos fungos ectomicorrízicos *Pisolithus* sp. (PT90A e RV82) e *Laccaria laccata* (ME46), crescidos por 25 dias na presença 2,26 mmol L⁻¹ de N-NH₄⁺, N-NO₃⁻ ou N-NH₄⁺/N-NO₃⁻ (1:1). A atividade de todas as enzimas variou entre os isolados e também com a fonte de nitrogênio utilizada no meio de crescimento. Em geral, os maiores valores de atividade foram observados no micélio do isolado RV82 *Pisolithus* sp. Este isolado também produziu maior quantidade de proteína. Não foi observado crescimento micelial do isolado ME46 quando cultivado em meio contendo N-NO₃⁻ como única fonte de nitrogênio. Foi também estudado, em tubetes com 50 cm³ de areia, o efeito de N-NO₃⁻, N-NH₄⁺ ou N-NH₄⁺/N-NO₃⁻ (1:1), nas doses de 50, 75, 100 ou 200 mg Kg⁻¹, sobre a colonização micorrízica, a produção e composição mineral da matéria seca, bem como as atividades das enzimas de assimilação de nitrogênio redutase do nitrato (RN), GDH, GS e GOGAT, em mudas de *E. grandis* inoculadas com os isolados acima. A atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio na planta

variou de acordo com a fonte e a dose de N aplicada e o fungo inoculado. Em geral, a atividade das enzimas na parte aérea das plantas foi maior do que na raiz, observando-se sempre maior atividade nas plantas inoculadas em relação às não inoculadas. No sistema radicular de plantas inoculadas com o ME46 e no das não-inoculadas não foi detectada atividade de RN e GDH. A produção de matéria seca e o conteúdo de nutrientes foi maior nas plantas inoculadas em relação às não-inoculadas. Concluiu-se que associação ectomicorrízica influencia a eficiência de utilização de diferentes formas de N pelas plantas, por alterar a atividade das enzimas de assimilação desse elemento.

ABSTRACT

CHIQUETE, Adalberto Antônio Sukumula, M.S. Universidade Federal de Viçosa, October, 2001. **Activity of nitrogen assimilation enzymes in ectomycorrhizal *Eucalyptus* seedlings.** Adviser: Maria Catarina Megumi Kasuya. Committee Members: Arnaldo Chaer Borges e Paulo Roberto Gomes Pereira.

The activity of glutamate dehydrogenase (GDH), glutamine synthetase (GS), and glutamate synthase (GOGAT) was determined in the mycelium of three isolates of the ectomycorrhizal fungi *Pisolithus* sp. (PT 90A and RV 82) and *Laccaria laccata* (ME46), grown for 25 days in media containing 2.26 mmol L⁻¹ N-NH₄⁺, N-NO₃⁻, and N-NH₄⁺/ N-NO₃⁻ (1:1). Enzyme activity varied among isolates and nitrogen sources added to the growth media. In general, the highest activity values were observed in the mycelium of RV 82. This isolate also presented the highest protein content recorded. No mycelial growth was observed for the isolate ME46 when grown in medium containing only N-NO₃⁻ as nitrogen source. The effect of N-NH₄⁺, N-NO₃⁻, and N-NH₄⁺/ N-NO₃⁻ (1:1), supplied at 50, 75, 100, and 200 mg kg⁻¹, on the ectomycorrhizal colonization, dry matter production, mineral composition, and on the activity of the nitrogen assimilation enzymes nitrate reductase (NR), GDH, GS, and GOGAT was studied in *E. grandis* seedlings inoculated with the fungal isolates PT 90A, RV 82, ME46. The activity of nitrogen assimilation enzymes in the plants varied with N source, dose, and fungal isolate used. In general, enzyme activity in the shoots was higher than that of the root system. Also, inoculated plants had higher enzyme activities than non-inoculated ones. In the root system of plants inoculated with ME46 and in that of non-inoculated plants, no activity of NR and GDH was observed. Dry matter production and nutrient content

were higher in inoculated plants compared to non-inoculated ones. The ectomycorrhizal association influences the utilization efficiency of different N sources in plants by altering the activities of nitrogen assimilation enzymes.

1. INTRODUÇÃO

A disponibilidade do N no solo é um dos fatores limitantes para o crescimento de espécies florestais. Vários estudos têm constatado a contribuição dos fungos micorrízicos na nutrição nitrogenada das plantas. Estudos “in vitro” de assimilação de nitrogênio inorgânico têm mostrado que os fungos micorrízicos utilizam preferencialmente o N-NH_4^+ , e apresentam variação intra e inter-específica na atividade das enzimas redutase do nitrato (RN), redutase do nitrito (NiR), glutamato desidrogenase (GDH) e glutamina sintetase/glutamato sintase (GS/GOGAT), dependendo da fonte e da concentração do nitrogênio. Em presença de N-NH_4^+ e N-NO_3^- , inicialmente o NH_4^+ é assimilado com alta atividade de GDH e GS/GOGAT e a síntese de RN ocorre posteriormente para a utilização do N-NO_3^- . A presença de micorrizas em mudas de *Eucalyptus grandis* promove aumento na atividade da RN nas folhas, com maior taxa de absorção de nitrato e aumento na produção de matéria seca. Considerando a hipótese de que a associação micorrízica pode alterar a eficiência de assimilação e a capacidade de conversão do nitrogênio em formas que são mais facilmente utilizáveis pela planta, alterando o metabolismo e a atividade das enzimas das vias de assimilação de N, o objetivo deste trabalho foi determinar a atividade dessas enzimas na parte aérea e no sistema radicular de mudas de *E. grandis*, com ou sem micorrizas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância, utilização e contribuição de fungos micorrízicos na nutrição nitrogenada das plantas

O nitrogênio é um dos principais constituintes de diversos compostos essenciais às células vivas, e fundamental para o crescimento de todos os organismos. Na célula, o nitrogênio faz parte da estrutura, desde pequenas moléculas como aminoácidos, nucleotídeos, antibióticos e vitaminas, até macromoléculas como proteínas, ácidos nucléicos e polissacarídeos complexos (TYLER, 1978; MARSCHNER, 1995).

Além do papel estrutural, os níveis e fontes de nitrogênio disponíveis podem regular diversos processos metabólicos (ROLLINS & GAUCHER, 1994), interferindo na atividade de enzimas do catabolismo ou na assimilação de formas não prontamente utilizáveis de nitrogênio, processo denominado “efeito amônio” ou repressão catabólica pelo nitrogênio (SCHREIER et al., 1982).

As plantas exercem função importante na ciclagem deste elemento na biosfera pela incorporação do NO_3^- , NH_3 e N_2 em moléculas orgânicas complexas (CRAWFORD et al., 1992). O íon amônio (NH_4^+) é a forma de nitrogênio inorgânico mais facilmente utilizável por fungos e bactérias, e mesmo compostos como nitrato e nitrito, antes de serem utilizados, são reduzidos para a forma NH_4^+ (MARSCHNER, 1995).

Os fungos micorrízicos contribuem de forma quantitativa e qualitativa para a nutrição nitrogenada das plantas (FINLAY et al., 1991). A importância dos fungos micorrízicos na absorção de nutrientes tem sido amplamente documentada, apesar dos poucos estudos sobre a função da fase micelial da simbiose no processo. O efeito da colonização na nutrição mineral, e nutrição fosfatada em particular, tem sido muito estudado (ADAMS & ATTIWILL, 1982; HARLEY & SMITH, 1983; JENTSCHKE et al., 1998).

Assume-se que o suprimento direto de fotoassimilados do hospedeiro para o fungo contribui para a sua habilidade de competição com outros componentes da microbiota do solo por nutrientes disponíveis. A nutrição fosfatada das ectomicorrizas tem sido extensivamente estudada mas, a fisiologia das interações entre a colonização e a nutrição nitrogenada é pouco conhecida (FINLAY et al., 1988). O efeito de diferentes compostos nitrogenados no crescimento vegetativo do fungo tem sido examinado e estudos de assimilação de nitrogênio em cultura pura têm sido feitos (LAIHO, 1970; LUNDERBERG, 1970; GENETET, MARTIN & STEWART, 1984; MARTIN, 1985; SILVA, 1996; VARAVALLO, 1998), mas a informação acerca do modo de absorção e metabolismo de compostos nitrogenados ainda é restrita.

A modificação da geometria e o aumento na superfície de absorção do sistema radicular micorrizado (BOWEN, 1973) aumenta a eficiência de absorção e translocação do nitrogênio orgânico para a raiz (FRANCE & REID, 1983). Isto pode ser importante principalmente em situações onde as concentrações de amônio disponível são reduzidas ou onde o fluxo em massa é severamente restrito em solos secos (CLARKE & BARLEY, 1968).

2.2. Assimilação de nitrogênio

Para plantas e alguns fungos do solo, o nitrato (NO_3^-) é a forma mais abundante de nitrogênio. Neste caso, para ser absorvido, o nitrato deve ser antes reduzido para NH_4^+ , pela ação conjunta das enzimas redutase do nitrato (RN; NADH, E.C. 1.6.6.1. ou NADPH, E.C. 1.6.6.2) e redutase do nitrito (NiR; E.C. 1.7.7.1).

A absorção preferencial de amônio ou nitrato pelos fungos micorrízicos parece ser altamente específica (BOWEN & SMITH, 1981). Estudos feitos com vários fungos ectomicorrízicos mostraram que a absorção de nitrogênio amoniacal foi maior do que do nítrico (LITTKE et al., 1984; GENETET, 1983; SILVA, 1996; VARAVALLO, 1998). A maioria destes resultados foram, contudo, obtidos em condições de culturas específica onde uma única forma de nitrogênio foi usada e pouco se sabe sobre as taxas de colonização por fungos ectomicorrízicos na presença de fontes combinadas de nitrogênio (PUTRA et al., 1999). Dados obtidos por estes autores demonstraram que a absorção de nitrato por *Scleroderma verrucosum* foi altamente correlacionada com a atividade da RN. Quando íons amônio estavam presentes no meio de incubação, a absorção do nitrato foi praticamente indetectável e a atividade da NR permaneceu negligível (PEREIRA,1993; SILVA, 1996 & PUTRA et al., 1999).

A atividade da RN de *S. verrucosum* parece diferir daquela do *H. cylindrosporium* (SCHEROMM et al., 1990), contudo, apesar deste último fungo ter sido crescido em amônio, teve uma atividade da RN equivalente àquela do crescido em nitrato. A capacidade de reduzir o $N-NO_3^-$ diferiu significativamente entre os fungos ectomicorrízicos *Pisolithus* sp., isolados IS83 e RS27, *Paxillus involutus* e *Scleroderma* sp., quando crescidos em meio de cultura com diversas fontes de N (PEREIRA, 1993). Este autor observou que a atividade da RN foi menor no micélio dos fungos após o crescimento em meio contendo apenas $N-NH_4^+$. Os isolados de *Pisolithus* sp. apresentaram atividade da RN seis vezes maior que a dos fungos *P. involutus* e *Scleroderma* sp, quando crescidos em meio contendo $N-NH_4^+$ e 2,5 e 8 vezes, respectivamente, quando o meio continha $N-NO_3^-$. Em plantas, NH_4^+ pode ser assimilado diretamente pelas raízes ou ser translocado para a parte aérea antes da assimilação (FORDE, 2000; BOTTON et al., 1994; OAKS, 1993).

O mecanismo de redução do nitrato em plantas superiores segue a reação abaixo:



A RN é a enzima chave envolvida na primeira fase de assimilação do nitrato pelas plantas. Ela catalisa a redução do nitrato para nitrito com piridina

nucleotídeo, uma redução de dois elétrons, e a nitrito redutase segue transformando o nitrito para amônia em uma reação que envolve a redução de seis elétrons (CRAWFORD, 1995; MARSCHNER, 1995; AHMAD & ABDIN, 1999). A colonização micorrízica pode alterar a eficiência de assimilação e a capacidade de conversão do nitrogênio em formas que são mais facilmente utilizáveis pela raiz (MARTIN, RAMSTEDT & SÖDERHÄLL, 1987).

Experimentos realizados por FINLAY et al. (1988, 1989) sugerem que muito do nitrogênio absorvido pelas micorrizas pode estar na forma orgânica, devido a assimilação do nitrogênio orgânico pelo micélio do fungo micorrízico, e a translocação na forma de aminoácidos para a interface fungo hospedeiro. A absorção de nitrogênio a partir do amônio e ácido glutâmico foi demonstrada primeiro por MELIN & NILSSON (1952, 1953) em sistemas assépticos contendo uma fonte exógena de carbono e micélio de *Suillus variegatus*. Estes autores não determinaram a forma na qual os compostos lábeis se movem, mas eles concluíram que o micélio fúngico desempenha uma função importante na translocação de compostos nitrogenados para plantas micorrizadas.

O processo de absorção de amônio foi estudado em micorrizas excisadas por CARRODUS (1966, 1967) o qual concluiu que o processo era metabolicamente dependente do suprimento de carboidratos que são utilizados, em parte, para a produção de aminoácidos a partir do amônio absorvido. Sob condições naturais, estes carboidratos podem ser supridos pelo hospedeiro e, em estudos envolvendo raízes excisadas, a aplicação exógena de carboidratos tem sido essencial para a rápida absorção de amônio.

O principal composto no qual o carbono fixado é sintetizado é a glutamina. A importância da glutamina como o primeiro produto da assimilação do amônio foi confirmada por MARTIN et al. (1986) que encontraram que a glutamina e o glutamato incorporaram a parte principal do nitrogênio suprido em micorrizas excisadas.

A assimilação do nitrato está associada ao ganho de biomassa pela planta durante todo o estágio vegetativo até o florescimento (FABRE & PLANCHON, 2000). Praticamente todas as plantas podem usar o nitrato como fonte de nitrogênio e a maioria das espécies é capaz de reduzir o nitrato tanto na raiz como na parte aérea (RUNGE, 1983).

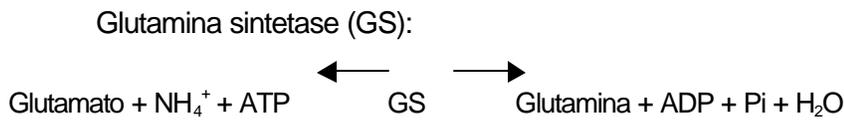
A extensão de redução do nitrato nas raízes e parte aérea depende da forma do N (nitrato, ou nitrato e amônio), da quantidade de nitrato suprido e da

quantidade de radiação, sendo que a presença de amônio no meio radicular das plantas pode suprimir a redução do nitrato (PEUKE & KAISER, 1996). Segundo estes autores, com o aumento da concentração do nitrato no meio radicular, a contribuição da redução do nitrato na parte aérea geralmente aumenta, o que tem sido explicado pela saturação no processo de redução do nitrato na raiz

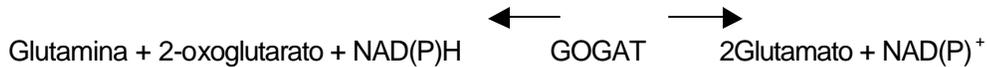
HO e TRAPPE (1980) frisaram que a alta atividade da RN nas raízes de *Pseudotsuga menziesii* poderia indicar maior eficiência dessas na utilização do nitrato. Contudo, ADAMS & ATIWILL (1982) mostraram que a atividade da RN em *Eucalyptus regnans*, *Eucalyptus obliqua* e *Pinus radiata* era altamente induzida pelo substrato da enzima, postulando que essa indução fosse provavelmente consequência e não a causa da “preferência” pela absorção de nitrato. Depois de absorvido, o nitrogênio inorgânico deve ser convertido, por mecanismos eficientes de assimilação, para a forma de um composto orgânico, geralmente grupos amina ou amida (MARTIN, 1985). Glutamato e glutamina são os principais doadores de nitrogênio das células para diversas reações do metabolismo, especialmente aquelas de biossíntese (LEHNINGER et al., 1993; TYLER, 1978). Duas vias são preferencialmente utilizadas pelas células para assimilação de $N-NH_4^+$ (DAWES & SUTHERLAND, 1992). A primeira, considerada de baixa afinidade, envolve a enzima glutamato desidrogenase (GDH), que catalisa a aminação redutiva do 2-oxoglutarato produzindo glutamato (NADP-GDH, E.C. 1.4.1.4), ou a desaminação oxidativa do glutamato produzindo amônio (NAD-GDH, E.C. 1.4.1.2), de acordo com a seguinte equação (KHOLY et al., 1993; ERTAN, 1992):



Uma segunda via, de alta afinidade, é catalisada por duas enzimas: glutamina sintetase (GS; E.C. 6.3.1.2), e glutamato sintase (GOGAT; Fd-GOGAT, E.C. 1.4.1.13 ou NAD(P)H-GOGAT, E.C. 1.4.1.13), produzindo glutamina e glutamato, respectivamente, com gasto de ATP, de acordo com as equações abaixo (KHOLY et al., 1993; LEHNINGER et al., 1993):



a) Glutamato sintase:



A atividade de GOGAT, dependente de ferredoxina, foi verificada em cloroplastos de folhas, cotilédones e raízes, diferindo daquela encontrada em microorganismos, dependente de NAD(P)H (OAKS, 1993):



SILVA (1996) e VARAVALLO (1998) observaram que na assimilação de nitrogênio inorgânico por fungos ectomicorrízicos a atividade da GDH e GS no micélio de *Pisolithus* sp., isolados PT90 A e RV82, é maior quando se utilizam doses reduzidas de nitrogênio no meio de crescimento. Entretanto a atividade da GOGAT nestes isolados não foi observada. Em *Cenococcum geophilum* (GENETET et al., 1984), *Hebeloma* sp., (CHALOT et al., 1991), *Laccaria bicolor* (MARTIN et al., 1988, 1994) e dois isolados de *Pisolithus* sp., 90A e RV82 (SILVA, 1996), a GDH NADP-dependente e a GS são as principais enzimas envolvidas na assimilação do amônio. Com base em estudos enzimáticos em fungos micorrízicos de *Pinus* sp., RUDAWSKA et al. (1994) concluíram que a via da GS para a assimilação do amônio é mais eficiente em fungos ectomicorrízicos e que existe pequena participação da GDH. Em ectomicorrizas, a assimilação do amônio exclusivamente pelo ciclo GS/GOGAT foi interpretada como evidência de que a via da GDH do fungo era reprimida (MARTIN et al., 1986).

Em geral a atividade das enzimas do nitrogênio nas folhas de *Spirodela polyrhiza* irradiadas com luz visível ou UVB, aumenta quando as plantas são crescidas na presença de luz, quando comparada ao crescimento no escuro e o aumento mediado pela luz é quase completamente abolido ou altamente inibido pela radiação UVB (SCHWALBE et al., 1999). Estes autores verificaram grande aumento para RN e GOGAT dependente de NADH (NADH-GOGAT),

enquanto para NiR e GOGAT dependente de ferredoxina (Fd-GOGAT) houve apenas um aumento moderado e pequeno para GS. Nas raízes, a presença de luz aumentou a atividade da NR e Fd-GOGAT, enquanto o efeito na NiR e GS foi pequeno. Altos níveis de atividade da RN em *Acacia dealbata* foram associados com maior taxa de nitrificação no solo, enquanto para *Eucalyptus obliqua* e *Pinus radiata*, baixas atividades da enzima corresponderam a baixos níveis de nitrificação no solo (ADAMS & ATIWILL, 1982).

2.3. Efeito do nitrogênio e micorrizas na produção florestal

Espécies florestais têm respondido diferentemente ao nitrato e ao amônio (KRAJINA et al., 1973; PATE, 1973). Muitas delas podem utilizar ambas as formas, embora HO e TRAPPE (1980) tenham argumentado que ocorre variação entre espécies quanto à forma de N mais absorvida. O amônio tem sido considerado a forma tolerada por *Pinus contorta* (KRAJINA et al., 1973), *Picea engelmanni* (BIGG & DANIEL, 1978) e *Eucalyptus obliqua* (ADAMS & ATIWILL, 1982).

A fertilização nitrogenada do eucalipto tem trazido respostas significativas da planta nos seus estádios iniciais de crescimento, isto é, formação de mudas a nível de viveiro (NOVAIS et al., 1980) ou no campo, após o transplantio das mudas (BARROS et al., 1981). No entanto perguntas básicas sobre qual forma de nitrogênio é mais absorvida (nitrata ou amôniaca), além de outras, são freqüentemente levantadas. Muito pouco se conhece sobre os padrões de absorção e assimilação do nitrogênio por espécies florestais, especialmente as associadas a solos em que o N-NO_3^- pode estar ausente ou presente em quantidade muito pequena (BARROS & NOVAIS, 1990). De acordo com estes autores, esse caso é típico do eucalipto em cerrado cujos solos, pela elevada acidez e extremo dimorfismo, apresentam condições precárias de nitrificação. Uma vez que o eucalipto normalmente está associado a solos com essas características, nos quais o alumínio é componente importante na relação solo-planta, a forma N-NH_4^+ deve ser de grande importância para essa planta (BARROS & NOVAIS, 1990).

O mecanismo de absorção de nitrogênio pelo eucalipto apresenta maior afinidade com o N-NH_4^+ , evidenciada pelo menor K_m e pelo $C_{min-NH}_4^+$ que é

consideravelmente menor que o $C_{min-N-NO_3}$ (VALE et al., 1984). Essas diferenças marcantes são de grande importância para o aumento da eficiência de absorção do nitrogênio disponível no solo, isto porque uma das maneiras de minimizar as perdas de nitrogênio por lixiviação é manter uma concentração baixa deste na solução do solo, sem contudo, restringir sua absorção abaixo daquela necessária para um bom suprimento de nitrogênio para a planta (VALE et al., 1984).

A maior eficiência do eucalipto em absorver a forma $N-NH_4^+$ pode ser também reflexo de uma adaptação ecológica dessa espécie a solos ácidos, onde é frequentemente encontrado (MOORE & KERALITIS, 1971), como também acontece com o *Pinus*. Os autores atribuem este fato à evolução de ecossistemas florestais e à economia de energia. A economia de energia decorre do fato de a incorporação do NH_4^+ aos esqueletos carbônicos ser imediata, ao contrário do NO_3^- , que deverá antes ser reduzido pela enzima NR, o que implica em gasto de energia.

LOCATELLI (1984) observou que o $N-NH_4^+$ foi mais absorvido do que o $N-NO_3^-$ pelas mudas de *E. grandis*. Entretanto, a produção máxima de massa seca total foi obtida com a relação percentual de 50% $N-NH_4^+$ / 50% $N-NO_3^-$. A produção máxima de raízes foi obtida com 59% de NO_3^- na solução e para parte aérea com apenas 39% de NO_3^- . ADAMS & ATTWILL (1982), sugerem que a atividade da NR é pequena nestas espécies com relação a outras que crescem preferencialmente em solos com condições favoráveis a uma nitrificação intensa.

Em regiões temperadas do hemisfério norte, ectomicorrizas exercem uma função importante no suprimento de água e nutrientes às árvores florestais, particularmente com respeito a fósforo e nitrogênio (MARSCHNER, 1995). No caso de suprimento supra ótimo de N, o número de micorrizas decresce fortemente devido a mudanças que ocorrem no sistema radicular (KOTTKE, 1995).

A fertilização de mudas de *Quercus robur* resultou em baixa colonização micorrízica, causada pela grande redução no número de raízes finas (THOMAS & HILKER, 2000). Nestas plantas, é improvável que as micorrizas exerçam grande influência sobre a relação dos nutrientes, pois o estudo revelou possíveis mudanças no metabolismo do nitrato em condições de contínuo suprimento de nitrato.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Atividade enzimática do micélio

3.1.1. Crescimento micelial

Foram utilizados os isolados PT90A e RV82 do fungo *Pisolithus* sp., e o isolado ME46 do fungo *Laccaria laccata*, obtidos da coleção de fungos ectomicorrízicos do Laboratório de Associações Micorrízicas do Departamento de Microbiologia, Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária - BIOAGRO - da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

O micélio foi produzido a partir de colônias crescidas em meio MNM (MARX, 1969) e incubadas a 28°C por 25 dias. Foi retirado um disco de 7mm de diâmetro da borda da colônia que foi transferido para uma placa de Petri, contendo meio MNM com diferentes fontes de nitrogênio, NaNO₃, (NH₄)₂SO₄ ou NH₄NO₃ na concentração de 2,26 mmol L⁻¹ e papel celofane sobre o meio de cultivo, e incubadas em câmara de crescimento, a 28°C por 25 dias.

3.1.2. Extrato micelial

O micélio crescido sobre o papel-celofane foi retirado, pesado e colocado em tubos de Eppendorf, congelado em nitrogênio líquido e estocado à

temperatura de -86°C . Duzentas e cinqüenta miligramas desse micélio estocado foram transferidos para almofariz de porcelana contendo 2,5 mL de tampão de extração (VÉZINA et al., 1989), constituído de 50 mmol L^{-1} de Tris-HCl pH 7,6, 5,0 mmol L^{-1} de glutamato, 0,5 mmol L^{-1} de ditioneitol, glicerol 10% (v/v), 10 mmol L^{-1} de MgSO_4 e 50% de polivinilpirrolidona (PVPP). Macerou-se o material, por dois minutos, a 4°C . Todo o material utilizado para a extração da enzima foi resfriado previamente à temperatura de 0 a 4°C . Após o rompimento das hifas, feito manualmente, o material foi centrifugado a 20.000 g por 30 minutos, a 4°C (Sorvall RC5C) e o sobrenadante coletado para determinação do teor protéico e análises enzimáticas.

3.1.3. Proteína total

O teor de proteína no sobrenadante foi avaliado pelo método descrito por LOWRY et al. (1951), utilizando-se soro albumina bovina (BSA) como padrão.

3.1.4. Atividade da glutamato desidrogenase (GDH)

A atividade da GDH foi determinada pela reação de aminação redutiva do α -cetoglutarato, modificando-se a técnica descrita por BRUN et al. (1992). A mistura de reação (15 mmol L^{-1} de α -cetoglutarato, 192 mmol L^{-1} de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em 100 mmol L^{-1} de tampão fosfato pH 7,5) foi incubada em banho-maria a 38°C . Foram adicionados à cubeta 1,0 mL da mistura de reação, 350 μL do extrato micelial, sendo a reação iniciada pela adição de 150 μL de solução de 1,63 mmol L^{-1} de NADPH. A atividade de GDH foi determinada acompanhando-se a oxidação do NADPH a 340 nm por cinco minutos (Pharmacia-Biotech Ultrospec 3000). O coeficiente de extinção molar de 6,22 mmol $\text{L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi usado para converter os valores de variação da absorbância em nmoles de NADPH oxidado. Os controles foram realizados na ausência de α -cetoglutarato. As soluções de NADPH foram conservadas a 4°C por, no

máximo, 15 dias. A atividade da GDH no micélio foi expressa em nmoles de NADPH oxidado por minuto por miligrama de proteína.

3.1.5. Atividade da glutamina sintetase (GS)

A mistura de reação para determinação da atividade da GS constituiu-se de 250 μL do extrato micelial, 50 μL de água destilada e 300 μL do meio de reação contendo 4,28 mmol L^{-1} de ATP, 28,57 mmol L^{-1} de MgSO_4 , 42,86 mmol L^{-1} de L-glutamato e 28,57 mmol L^{-1} de tampão imidazol pH 5,7 (VÉZINA et al, 1988). A reação foi iniciada com a adição de 100 μL de 4,28 mmol L^{-1} de hidroxilamina. A mistura de reação foi incubada em banho-maria a 38 °C por 40 minutos, e interrompida pela adição de 700 μL de uma solução contendo 0,67 mol L^{-1} de HCl, 0,2 mol L^{-1} de ácido tricloroacético e 0,37 mol L^{-1} de FeCl_3 . Todo o volume foi transferido para tubo Eppendorf e centrifugado (Eppendorf 5415) a 2.000 rpm por 10 minutos. A determinação da quantidade de γ -glutamil hidroxamato em substituição à hidroxilamina foi feita por colorimetria lendo-se a densidade ótica a 540nm em espectrofotômetro (Micronal B390). A atividade da GS foi expressa em nmoles de γ -glutamil hidroxamato por minuto por miligrama de proteína.

3.1.6. Atividade da glutamato sintase (GOGAT)

A atividade da GOGAT foi medida em 0,3 mL do extrato adicionado de 1,1 mL do meio de reação contendo 5,0 mmol L^{-1} de L-glutamina, 5,0 mmol L^{-1} de α -cetoglutarato e 50,0 mmol L^{-1} de tampão Tris-HCl, pH 7,5 (DOUGALL, 1974). A temperatura da mistura foi uniformizada em banho-maria a 38°C, por dois minutos. A reação foi conduzida por quatro minutos. O diferencial de absorvância no período foi dividido pelo coeficiente de extinção molar de 6,22 mmol L^{-1} de NADPH, para o cálculo da quantidade de NADPH oxidado. A atividade da GOGAT no micélio foi expressa em nmoles de NADPH oxidado por minuto por miligrama de proteína.

3.2.ATIVIDADE ENZIMÁTICA NA PLANTA

3.2.1.Obtenção do inóculo

Foram utilizados os isolados PT90A e RV82 do fungo *Pisolithus* sp., e o isolado ME46 do fungo *Laccaria laccata* da coleção de fungos do Laboratório de Associações Micorrízicas do Departamento de Microbiologia, Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária - BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG.

Para a obtenção do inóculo, o micélio do fungo foi transferido para placas de Petri contendo 20 mL de meio Merlin Norkrans modificado sólido (MARX, 1969), e mantidas em incubadora a 28 °C por 25 dias.

3.2.2.Obtenção das plantas

Sementes de *E. grandis* foram desinfestadas superficialmente com álcool etílico a 70% por 1 minuto, seguida de imersão em peróxido de hidrogênio a 20% durante 6 minutos. Após a desinfestação, foram lavadas com água destilada e semeadas em bandejas plásticas contendo areia estéril, mantidas à temperatura ambiente durante 30 dias.

3.2.3.Transplântio e inoculação

Cada muda foi transplantada para um tubete plástico contendo 50 cm³ do substrato, areia e alumina, na proporção de 2,5 g de alumina carregada com uma solução 2 mmol de fósforo (GOURLEY et al., 1993), por 50g de areia lavada em ácido. No momento do transplântio, cada muda foi inoculada com 2 discos de ágar, de 10,44 mm de diâmetro, contendo micélio dos fungos, que foram colocados junto ao sistema radicular. As plantas foram crescidas em casa de vegetação num esquema fatorial (4 x 4 x 3), sendo três inoculadas com fungos ectomicorrízicos um controle não inoculado, quatro concentrações de nitrogênio, 50; 75; 100 ou 200 mg Kg⁻¹ e três fontes de nitrogênio, NaNO₃, (NH₄)₂SO₄ e NH₄NO₃ em 3 blocos casualizados. Foram feitas aplicações

periódicas de nutrientes através de solução nutritiva de Clark ¼ de força (CLARK, 1975), variando-se a concentração do nitrogênio de acordo com as fontes e as doses testadas e também pela eliminação do fósforo. Este experimento foi repetido 2 vezes em paralelo, sendo uma parte utilizada para avaliação de matéria seca e análise nutricional e a outra para avaliação da colonização micorrízica e análises enzimáticas.

3.2.4.Colonização micorrízica

As raízes finas foram cortadas em segmentos de 2 cm e armazenadas em solução fixadora de F.A.A. (5 mL de formol, 5 mL de ácido acético e 90 mL de álcool etílico) para posterior determinação da porcentagem de comprimento de raízes colonizadas, pelo o método das interseções em placa reticulada proposto por AMBLER e YOUNG (1977) e modificado por GIOVANNETTI e MOSSE (1980).

3.2.5.Atividade da redutase do nitrato (RN) (E.C.1.6.6.1) na parte aérea e no sistema radicular de mudas de *Eucalyptus grandis*

As plantas destinadas à determinação da RN foram transferidas para uma câmara de crescimento, onde cada planta recebeu 20 mL de uma solução de 200 mM de N na forma de KNO_3 e permaneceu por 24 horas sob, aproximadamente, $230 \mu\text{moles de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa (PEREIRA, 1993). Decorrido esse período de tempo foram retirados 40 discos de 0,5 cm de diâmetro de folhas completamente expandidas, do mesmo entrenó, na região do terço superior, correspondendo a, aproximadamente, 200 mg de matéria fresca (PEREIRA, 1993). Esses discos foram colocados em frascos de vidro envoltos em papel alumínio, contendo 5 mL da mistura de reação constituída de: 0,1M de tampão fosfato pH 7,5, 0,02M de KNO_3 , n-propanol a 5%, duas gotas de cloranfenicol a 500 mg.L^{-1} e duas gotas de triton x-100 a 10% (LAWRENCE & HERRIK, 1982). Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria, com agitação, à temperatura de

30°C, por uma hora. Alíquotas de 2 mL foram coletadas do meio de incubação e adicionadas a 2 mL de sulfanilamida a 1% e n-naftiletilenodiamino a 0,02% em HCL 3N. O nitrato liberado na reação foi determinado colorimetricamente a 540 nm em espectrofotômetro (JAWORSKI, 1971) e os resultados expressos em miligramas de nitrito produzido por grama de matéria seca por hora ($\text{mg NO}_2^- \text{g MS}^{-1}$).

3.2.6.Extrato de planta

Para a determinação da atividade enzimática, foram amostradas folhas medianas completamente expandidas e o terço médio do sistema radicular. A extração da enzima foi realizada em meio constituído de tampão Tris pH 7,9 (50mM), MgSO_4 (20 mM), EDTA (1mM), 2-mercaptoetanol (74mM), conforme OAKS et al., (1980), e caseína (2,5%), como recomendado por KAISER & LEWIS (1984).

Para o preparo do extrato enzimático cru, tomou-se 1,0 g de folha ou 2,0 g de raiz (lavadas com água destilada e enxugadas em papel absorvente), cortadas em pequenos pedaços. O material foi macerado manualmente em almofariz de porcelana, por dois minutos, a 4°C, na presença de 1 g de areia lavada, 10 mL de meio de extração e 0,5 g de polivinilpirrolidina por grama de tecido. Todo o material utilizado para a extração da enzima foi resfriado previamente à temperatura de 0 a 4°C. O homogeneizado foi, então, centrifugado a 15000g, por 20 minutos, em centrífuga refrigerada (4°C) e os tubos, com o sobrenadante, imersos em gelo.

3.2.7.Atividade da glutamina sintetase (GS) (E.C.6.3.1.2) na parte aérea e sistema radicular de mudas de *E. grandis*

A atividade da sintetase de L-glutamina foi determinada, adicionando-se 0,1 mL do extrato cru foliar ou 0,2 mL do radicular à seguinte mistura de reação: L-glutamato (80 mM), hidroxilamina (6 mM), ATP (8 mM, pH ajustado para 7,9), TRICINE (200 mM, pH 7,8), MgSO_4 (4 mM), EDTA (0,2 mM) (OAKS et al., 1980) e 2-mercaptoetanol (15mM) (NESSELHUT & HARNISCHFEGER,

1981). O volume final da mistura de reação foi de 3,0 mL. Somente quando os tubos foram incubados à 35°C, foi adicionada a hidroxilamina para iniciar a reação. Após 30 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL do reagente de cloreto férrico (10 g de ácido tricloroacético e 8 g de cloreto férrico anidro em 250 ml de HCl 0,5N), segundo RATAJCZAK et al. (1981). A mistura foi, então, centrifugada a 10.000 g, durante 10 min, e a absorvância do quelato Fe-L-glutamil- γ -hidroxamato no sobrenadante, medida a 540 nm. Os brancos receberam todos os reagentes, exceto a hidroxilamina. A atividade enzimática foi expressa em miligramas de L-glutamil- γ -hidroxamato (GHA) formado por grama de matéria seca ($\text{mg de GHA min}^{-1} \text{ g MS}^{-1}$).

3.2.8. Atividade da glutamato desidrogenase (GDH) na parte aérea e sistema radicular de mudas de *E. grandis*

A atividade da GDH foi determinada pela reação de aminação redutiva do α -cetoglutarato, modificando-se a técnica descrita por BRUN et al. (1992), procedendo-se a seqüência da reação como demonstrado no item 3.1.4.

3.2.9. Atividade da glutamato sintase (GOGAT) na parte aérea e sistema radicular de mudas de *E. grandis*

A atividade da GOGAT foi medida em 0,3 mL do extrato de planta adicionado de 1,1 mL do meio de reação contendo 5,0 mmol L⁻¹ de L-glutamina, 5,0 mmol L⁻¹ de α -cetoglutarato e 50,0 mmol L⁻¹ de tampão Tris-HCl, pH 7,5 (DOUGALL, 1974), procedendo-se a seqüência da reação como demonstrado no item 3.1.6.

3.2.10. Matéria seca e composição nutricional

O sistema radicular e a parte aérea das plantas foram submetidos à secagem em estufa de ventilação forçada a 75°C por 72 horas, determinando-se o peso de matéria seca da parte aérea e raiz. As amostras foram trituradas

em moinho tipo Willie, com peneira de malha de 0,25 mm e em seguida 200 mg deste material foram mineralizados por digestão sulfúrica, obtendo-se os extratos para as análises de nutrientes na planta. Foi feita determinação colorimétrica do fósforo nos extratos do material vegetal, em espectrofotômetro, pelo método de BRAGA & DEFELIPO (1974). O nitrogênio total foi determinado pelo método proposto por CATALDO (1974).

3.2.11. Análises estatísticas

Os valores das atividades das enzimas no micélio, após a análise de variância foram submetidos ao teste tukey a 5% de probabilidade.

Os dados de proteína total, atividades das enzimas, colonização e matéria seca, visando determinar possíveis efeitos da colonização, do gênero e dos isolados dentro de espécies dos fungos testados e os graus de liberdade foram desdobrados segundo os contrastes ortogonais descritos a seguir:

C1 = (Não micorrizadas) x (Micorrizadas)

C2 = (*Pisolithus* sp.) x (*Laccaria laccata*)

C3 = (*Pisolithus* - 90A) x (*Pisolithus* - RV82)

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio no micélio

As atividades das enzimas de assimilação do nitrogênio GDH (Figura 1A), GS (Figura 1B) e GOGAT (Figura 1C) variaram com o isolado fúngico e a fonte de nitrogênio, como verificado por SILVA (1996), VARAVALLO (1998) e PUTRA et al. (1999).

O isolado RV82 foi o que apresentou a maior atividade de GDH (Figura 1A), com 2,86 nmoles de NADPH oxidado min^{-1} mg de proteína⁻¹, quando crescido em meio com N-NH_4^+ , enquanto para os isolados PT90A e ME46 a maior atividade dessa enzima foi, respectivamente, de 2,11 e 1,96 nmoles de NADPH oxidado min^{-1} mg de proteína⁻¹, quando cultivados em meio contendo $\text{N-NH}_4^+/\text{NO}_3^-$. Entretanto, esses valores são ainda bastante baixos comparados aos encontrados por SILVA (1996) e VARAVALLO (1998), que foi de até 50 e 15 nmoles de NADPH oxidado min^{-1} mg de proteína⁻¹, respectivamente. Valores de atividade de GDH encontrados aqui, estão próximos daqueles encontrados para *H. cylindrosporium* (CHALOT et al., 1991), *Paxillus involutus* 1 (RUDAWSKA et al., 1994) e *Scleroderma verrucosum* (PUTRA et al., 1999).

Os valores de atividade de GDH no isolado ME46 foram menores do que os de outro isolado de *L. laccata*, S238 (BRUN et al., 1992). A indução da atividade dessa enzima ocorre quando há uma alta concentração de NH_4^+ no meio de crescimento, o que corresponde a uma concentração intracelular de 2 a 4 mmol L^{-1} , suficiente para a ação da GDH NADP-dependente (BRUN et al. 1992). No presente experimento, a concentração de N total no meio de crescimento foi de 2,26 mmol L^{-1} , a normalmente utilizada para o crescimento de fungos micorrízicos. É interessante observar que a atividade da GS (Figura

1B) foi maior que de GDH, pois a enzima GS possui alta afinidade pelo NH_4^+ e apresenta maior atividade quando este elemento está em baixas quantidades (GRIFFIN, 1994). As maiores atividades da enzima GS foram de 37,4 nmoles no RV82 crescido em N-NH_4^+ , 34,9 nmoles no ME46 crescido em $\text{N-NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ e 17,5 nmoles de glutamil hidroxamato $\text{min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ no micélio de 90A crescido em N-NO_3^- (Figura 1B). Esses valores são próximos aos encontrados por SILVA (1996) que foram de 32 nmoles, em RV82 e de 35 nmoles de glutamil hidroxamato $\text{min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ no micélio em 90A, nas mesmas condições de cultivo. Valores muito menores de atividade de GS foram obtidos por PUTRA et al. (1999) em *S. verrucosum* (6,0 nmoles de glutamil hidroxamato $\text{min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$) e VARAVALLO (1998) em *P. tinctorius* (3,0 nmoles de glutamil hidroxamato $\text{min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$). A atividade da GS no ME46 foi também muito semelhante ao encontrados por BRUN et al. (1992) em *L. laccata*, que foi de 23 nmoles de glutamil hidroxamato $\text{min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ no micélio.

Foi observada atividade de GOGAT no micélio de todos os fungos testados (Figura 1C). A maior atividade foi observada no isolado RV82 quando cultivado em meio com fonte N-NH_4^+ , apresentando 2,5 nmoles de NADPH oxidado $\text{min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$. O isolado 90A apresentou sua maior atividade quando cultivado em meio com fonte combinada de nitrogênio (1,5 nmoles de NADPH oxidado $\text{min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$) e o ME46 teve sua maior atividade de GOGAT quando crescido em meio com N-NH_4^+ (1,3 nmoles de NADPH oxidado $\text{min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$). Os valores observados por PUTRA et al. (1999) em *S. verrucosum* foi de 78 nmoles de NADPH oxidado $\text{min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$, muito maior que os encontrado neste experimento (Figura 1C). Entretanto, VÉZINA et al. (1989) detectaram níveis muito baixos de GOGAT quando comparados com os da atividade da GS e com outras enzimas de assimilação do nitrogênio. A atividade da GOGAT não foi detectada por SILVA (1986) e VARAVALLO (1998) nos isolados de *Pisolithus* sp. e por MARTIN et al. (1988) em micélio de *Cenococcum geophilum*. Estes últimos sugeriram que a GOGAT

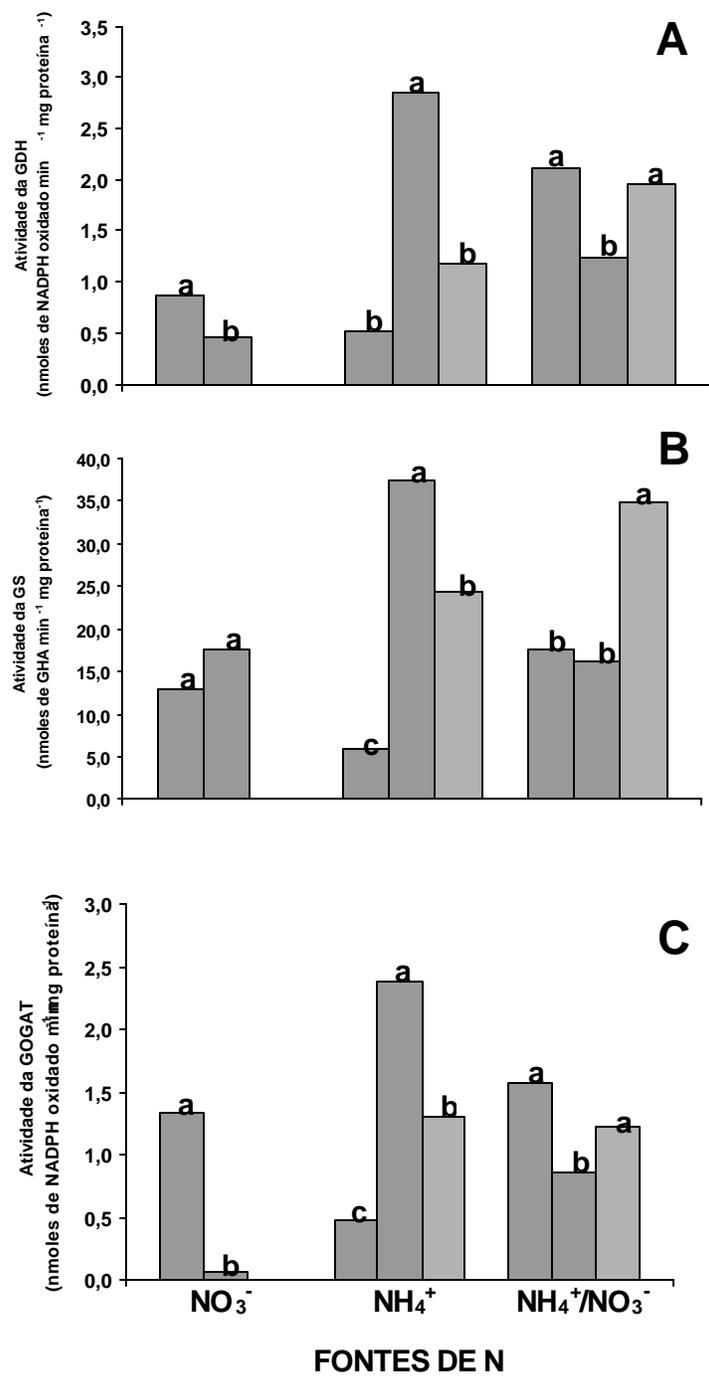


Figura 1 – Atividade das enzimas (A) glutamato desidrogenase (GDH), (B) glutamina sintetase (GS) e (C) glutamato sintase (GOGAT) no micélio dos fungos ectomicorrízicos *Pisolithus* sp., isolados 90A (□) e RV82 (▨), e *Laccaria laccata*, isolado (▩).

não exerça função na síntese de glutamato. Esses dados indicam uma função secundária dessa enzima no processo de assimilação de nitrogênio por alguns isolados.

4.2. Proteínas na planta

A concentração de proteínas foi maior na parte aérea (Quadro 1), variando de 23,8 a 69,9 mg g⁻¹ matéria seca, do que no sistema radicular (Quadro 2) onde a variação foi de 24,4 a 44.1 mg g⁻¹ matéria seca. Em geral, a concentração de proteínas na parte aérea das plantas foi baixa quando a concentração de N adicionado foi de 50 e 200 mg kg⁻¹ (Quadro 1).

A concentração média de proteínas na parte aérea e no sistema radicular, foi em geral maior nas plantas micorrizadas independente da fonte de N utilizada, variando de acordo com a dose de nitrogênio. No sistema radicular das plantas supridas com nitrato, não houve diferença na concentração de proteínas quando as concentrações de N foram de 75 e 100 mg kg⁻¹ (Quadro 2). Para plantas supridas com N-NO₃⁻ e N-NH₄⁺/NO₃⁻, apresentaram maior concentração de proteínas na parte aérea aquelas micorrizadas por *Pisolithus* sp. do que aquelas micorrizadas pelo *L. laccata* (Quadro 1). No sistema radicular destas plantas houve maior concentração de proteínas nas plantas micorrizadas por *Pisolithus* quando supridas com 75 e 100 mg kg⁻¹ de N-NO₃⁻ e nas plantas micorrizadas por *L. laccata* quando supridas com 75 a 200 mg kg⁻¹ de N-NH₄⁺/NO₃⁻ (Quadro 2). Em geral, a concentração de proteínas no sistema radicular das plantas inoculadas com *Pisolithus* foi maior naquelas micorrizadas pelo isolado RV82 quando supridas N-NO₃⁻ e N-NH₄⁺/NO₃⁻, e maior concentração de proteínas naquelas micorrizadas pelo isolado 90A quando as plantas foram supridas com N-NH₄⁺ (Quadro 2). Entretanto, na parte aérea, as maiores concentrações de proteínas ocorreram nas plantas micorrizadas pelo isolado RV82 (Quadro 1) independentemente da fonte de nitrogênio disponível, exceto na concentração de 50 mg kg⁻¹. Na presença de N-NH₄⁺, não houve diferença na concentração de proteínas na parte aérea quando a concentração do N aplicada foi de 50 e 200 mg kg⁻¹. Esta variação na concentração de proteínas das plantas inoculadas dependendo da dose e fonte de N aplicada, sugere diferença

quanto à eficiência de utilização das diferentes formas de N pelos fungos ectomicorrízicos.

4.3. Atividade da redutase do nitrato na planta

Na parte aérea das plantas houve grande variação na atividade da RN, dependendo da fonte e da dose de nitrogênio utilizadas. A diferença na atividade desta enzima entre plantas micorrizadas e não micorrizadas variou com o fungo utilizado, observando-se tendência de maior atividade em plantas não micorrizadas do que nas micorrizadas com *Pisolithus* sp., e aumento na atividade da RN com o aumento da dose de N no substrato (Quadro 3). Plantas micorrizadas pelo fungo *L. laccata* apresentaram em geral maior atividade do que aquelas não inoculadas. Não foi detectada atividade desta enzima no sistema radicular de plantas micorrizadas com o isolado ME46 e no das não micorrizadas. Entretanto, no sistema radicular das plantas inoculadas com os isolados 90A e RV82 (Quadro 4), tenderam a diminuir essa atividade com o aumento da disponibilidade de N.

HAWKINS (1999) encontrou maior atividade de RN em plantas inoculadas com *Glomus mosseae*, sendo que a atividade foi sempre maior na parte aérea do que no sistema radicular e o aumento no suprimento de N aumentou a atividade da RN na parte aérea das plantas. PEREIRA (1993) encontrou diferença entre a atividade da RN da parte aérea das plantas de *E. grandis*, inoculadas com o isolado RS27 do fungo ectomicorrízico *P. tinctorius* e aquelas não-inoculadas ou inoculadas com o isolados IS83 do mesmo fungo, demonstrando assim, o efeito da presença da associação na atividade desta enzima. HENRIQUE (1991), encontrou maior atividade da RN no sistema radicular de *Pinus caribaea* colonizado por *P. tinctorius*, isolado 303, do que no de plantas não inoculadas, e na parte aérea não houve efeito da colonização micoprrízica na atividade da enzima.

O aumento na eficiência de aquisição de nitrogênio pelo sistema simbiótico não é apenas causado pelo aumento quantidade das raízes, mas também pela maior capacidade de redução do nitrato pelas micorrizas (VÉ ZINA et al., 1989 e SARJALA, 1991). Portanto, a identificação de isolados fúngicos com a maior capacidade de redução do nitrato é interessante para a obtenção de sistemas simbióticos que apresentem maior eficiência na utilização do nitrogênio na forma de nitrato.

Essa característica é também uma vantagem comparativa para uso desse fungo como inóculo em áreas onde haja presença de amônio e nitrato, ou predominância de nitrato no solo. Esta condição pode ocorrer em áreas de replantio de florestas de eucalipto, onde os níveis de nitrato podem ser elevados (COSTA, 1995).

4.4. Atividade de GDH, GS e GOGAT na planta

A atividade das enzimas GDH (Quadros 5 e 6), GS (Quadros 7 e 8) e GOGAT (Quadros 9 e 10) nas plantas, variou de acordo com a dose, fonte de N e isolado fúngico inoculado.

Na parte aérea das plantas micorrizadas, a atividade da GDH apresentou tendências variadas, em geral maior do que nas pelas plantas não-micorrizadas, mostrando o efeito da micorriza na atividade desta enzima (Quadro 5). No sistema radicular das plantas micorrizadas pelo ME46 e no das plantas não-micorrizadas, a atividade da GDH não foi detectada (Quadro 6). Apesar de ter sido detectado a atividade dessa enzima em plantas inoculadas com os isolados 90A e RV82 (Quadro 6) supridas com de $N-NH_4^+$ e $N-NH_4^+/NO_3^-$ não foi possível estabelecer uma tendência da cinética enzimática.

A queda na atividade da GDH em altas concentrações de $N-NO_3^-$, observada na parte aérea das plantas micorrizadas (Quadro 5), pode estar relacionada a mecanismos de repressão catabólica à semelhança do que ocorre em fungos, podendo estarem sendo produzidos na célula, glutamato e glutamina, por reações de transaminação ou pela ação da GS/GOGAT (OAKS et al., 1980). Além disto, podem estar presentes na célula, formas isoenzimáticas de GDH que estejam atuando nessa condição de suficiência ou excesso de nitrogênio (MANTOVANI, 1996).

Os valores de atividade da GS na parte aérea (Quadro 7) foram semelhantes em plantas inoculadas e não-inoculadas com tendência de serem maiores na dose de 75 mg kg^{-1} de N. Não foi possível estabelecer uma tendência de comportamento enzimático no sistema radicular de plantas não-inoculadas, uma vez que não foi detectada a presença dessa enzima na maioria dos extratos protéicos (Quadro 8). No entanto, o maiores valores de atividade desta enzima foram encontrados no sistema radicular das plantas inoculadas com o RV 82 quando supridas com 100 e 200 mg kg^{-1} de $N-NH_4^+$,

mostrando o efeito da micorrização por este fungo na atividade da GS na planta (Quadro 8). Não houve diferença na atividade da GS na parte aérea das plantas micorrizadas e não micorrizadas, exceto quando a concentração de N foi de 75 mg kg^{-1} em todas as fontes de N e quando as plantas foram supridas com 200 mg kg^{-1} de N-NO_3^- . Fato inverso observou-se no sistema radicular, onde a atividade da GS foi diferente entre as plantas micorrizadas e as não micorrizadas, sendo maior nas plantas micorrizadas (Quadro 8).

A GS pode ser regulada pela ação do íon Mg^{2+} , pH e carga energética, os quais são alterados na presença de luz (NESSELHUT et al., 1981). VÉZINA et al. (1989) observaram que plantas de *Pinus banksiana* inoculadas com *P. tinctorius* e *L. bicolor* não apresentaram aumento na atividade das enzimas envolvidas no metabolismo primário do nitrogênio, sugerindo que a baixa atividade destas enzimas na simbiose pode estar relacionada ao efeito de diluição, onde a presença do sistema enzimático do fungo dilui a atividade específica do sistema simbiótico. Uma outra possibilidade é o fato de a colonização micorrízica poder inibir a expressão de genes que codificam para a enzima ou que a infecção estimula ou inibe a produção de compostos metabolicamente ativos que interferem na reação enzimática (VÉZINA et al., 1989). A contribuição da micorriza na via de assimilação de nitrogênio fornece vantagem adaptativa das plantas inoculadas, quando crescidas em condições com teores reduzidos de N-NH_4^+ (Pereira, 1993).

Os valores de atividade de GOGAT foram maiores na parte aérea (Quadro 9) que no sistema radicular (Quadro 10). Na parte aérea das plantas inoculadas com os isolados de *Pisolithus* sp., observou-se diferença na atividade desta enzima, corroborando com a afirmação de que há diferença intra-específica nos processos metabólicos entre os isolados deste fungo. No entanto, no sistema radicular destas plantas, não houve diferença na atividade da GOGAT em quase todos os tratamentos testados. Em geral, as plantas não micorrizadas apresentaram maior atividade desta enzima nas doses 50 e 200 mg kg^{-1} , sendo que nas doses intermediárias os valores foram maiores para plantas micorrizadas. Diferente do que acontece para a GS, em geral não houve diferença na atividade da GOGAT no sistema radicular das plantas micorrizadas e não-micorrizadas.

Na parte aérea de plantas inoculadas com o isolado 90A, observou-se um aumento nos valores de atividade com o aumento da dose de N, até atingir

100 mg kg⁻¹, observando-se uma queda na atividade da enzima quando a concentração de nitrogênio foi aumentada para 200 mg kg⁻¹ (Quadro 9). Tendência semelhante foi observada nas plantas inoculadas com o RV82, no entanto a dose de maior atividade da GOGAT na parte aérea destas plantas variou com a fonte de N disponível. A tendência de queda na atividade da enzima em altas concentrações de N pode estar relacionada a um processo de repressão catabólica (OAKS et al., 1980) também observado para GDH.

Nas plantas não-micorrizadas e nas micorrizadas por ME46 (Quadros 9 e 10), observou-se um comportamento diferente para cada fonte de nitrogênio utilizada, variando com a concentração. No sistema radicular de plantas, houve em geral um aumento na atividade da GOGAT com o aumento da dose de N, sendo os maiores valores obtidos para plantas micorrizadas com o ME46 (Quadro 10). Entretanto, a análise de contrastes mostrou que esta diferença não é significativa.

Os resultados da presente tese permitiram confirmar a hipótese de que a associação ectomicorrízica influencia a eficiência de utilização de diferentes formas de N pelas plantas por alterar a atividade das enzimas de assimilação desse elemento.

4.5. Colonização micorrízica e produção de matéria seca na planta

A colonização micorrízica (Quadro 11) e a produção de matéria seca da parte aérea (Quadro 12) e do sistema radicular (Quadro 13) variaram conforme o isolado, a fonte e a dose de N. O comportamento diferencial na colonização micorrízica entre os isolados *Pisolithus* sp. tem sido relatado por diversos autores (AMORIM, 1988; MENDONÇA, 1991; COMERLATO, 1992; PEREIRA, 1993).

A eficiência de colonização micorrízica variou conforme a fonte, a dose de N e o fungo inoculado (Quadro 11). Em média os maiores valores de micorrização foram obtidos nas doses de 75 e 100 mg kg⁻¹. PEREIRA (1993) observou que a colonização máxima de *E. grandis* por *P. tinctorius*, isolados IS83 e RS27, foram maiores nas doses de 75 a 100 mg kg⁻¹ de N-NO₃⁻. Entretanto, neste experimento nas plantas micorrizadas pelo ME46 a maior taxa de colonização foi obtida quando supridas com 50 mg kg⁻¹ de N-NO₃⁻. Considerando-se que não houve crescimento micelial do isolado ME46 em

meio de cultura, contendo nitrato como única fonte de N, sugere-se que, nessas condições, houve translocação de produtos do metabolismo do nitrogênio da planta para o fungo, fornecendo as condições necessárias para o crescimento micelial e para a associação. Pode-se observar, também, que apesar da boa colonização, essas plantas crescidas em presença apenas do N-NO_3^- apresentaram baixa produção de matéria seca (Quadros 12 e 13). Contudo, esses valores foram muito próximos aos encontrados para as plantas não-inoculadas, principalmente nas menores doses de N adicionado ao substrato.

Em geral, em substratos com altas concentrações de nitrogênio, as plantas apresentaram baixas taxas de colonização micorrízica. Essa influência negativa de alta disponibilidade de nutrientes, principalmente, N e P, sobre a colonização micorrízica, pode estar relacionado à diminuição de carboidratos no sistema radicular das plantas e a aumentos no pH da rizosfera (BOWEN, 1973 e HARLEY & SMITH, 1983).

A média de produção de matéria seca na parte aérea pelas plantas micorrizadas variou de 83 a 570 mg planta^{-1} , sendo maior do que nas plantas não-micorrizadas onde houve uma variação de 42 a 177 mg planta^{-1} , conforme a fonte e a dose de N (Quadro 12). No entanto, a produção de matéria seca no sistema radicular de plantas micorrizadas (variando de 37 a 245 mg planta^{-1}) foi diferente daquela das plantas não-micorrizadas, apenas quando as plantas foram supridas com 50 mg kg^{-1} de N-NO_3^- e 50 e 75 mg kg^{-1} de N-NH_4^+ (Quadro 13). Em geral, a produção de MSPA das plantas micorrizadas pelo isolado 90A foi maior do que nas plantas micorrizadas pelo RV82, e a produção de plantas micorrizadas por estes dois isolados em média foi maior do que a das plantas micorrizadas pelo isolado ME46, mostrando diferença intra e interespecífica na eficiência dos fungos ectomicorrízicos em promover o crescimento da planta.

O melhor desempenho na produção de biomassa observado nas plantas micorrizadas, pode estar relacionado a um maior equilíbrio na absorção de nutrientes, e por consequência, maior crescimento e desenvolvimento da planta, proporcionados pela participação do fungo ectomicorrízico (Harley & Smith, 1983). Sugere-se assim, que plantas associadas a fungos micorrízicos podem sobreviver melhor, em condições de campo, onde é comum a baixa disponibilidade de água e de nutrientes.

Quando foram utilizados 200 mg kg⁻¹ de N-NO₃⁻ e N-NH₄⁺/NO₃⁻, observou-se uma queda produção de matéria seca, provavelmente, pela alta mobilidade da forma de N disponível aliada ao tamanho dos recipientes de cultivo e à alta densidade das raízes produzidas por esta espécie (Quadros 12 e 13). Nessas condições, a contribuição do micélio fúngico pode ser pouco expressiva, uma vez que não há limitação na disponibilidade e, conseqüentemente, na absorção desse elemento. A produção de matéria seca radicular de *E. grandis* não apresentou diferença, comparado ao controle não-inoculado, entre os isolados de *P. tinctorius* (COMERLATO, 1992 e PEREIRA, 1993) e também com outras outras espécies fúngicas (COMERLATO, 1992).

A variação na produção de matéria seca pelas plantas inoculadas com os diferentes isolados fúngicos, sugere uma maior ou menor eficiência na absorção de nutrientes e, portanto, em promover o crescimento da planta, visto que as taxas de colonização micorrízica (Quadro 11) nem sempre se relacionam com a máxima produção de biomassa (Quadros 12 e 13).

4.6. Composição mineral das plantas

Observou-se uma tendência de maior acúmulo de nutrientes minerais nas plantas micorrizadas comparadas às plantas não-micorrizadas, quando detectável (Quadros 14 e 16), mostrando o efeito das micorrizas em promover maior absorção de nutrientes. Os valores de N e P encontrados estão dentro da faixa de valores apresentados por NOVAIS e BARROS (1990) para mudas de *E. grandis* com 90 dias de idade. A concentração de N total tendeu a diminuir a medida em que se aumentou a dose de N aplicada. Plantas inoculadas com PT90A e RV82 apresentaram em geral menor concentração de N total em relação as inoculadas com o isolado ME46.

As plantas micorrizadas apresentaram maior conteúdo de P quando crescidas em substratos supridos com N-NH₄⁺. Além disto, plantas micorrizadas pelo RV82 tiveram maior concentração de P do que as micorrizadas pelo 90A. Quando as plantas foram crescidas na presença de N-NO₃⁻, aquelas micorrizadas pelo ME46 apresentaram maior concentração de P do que as plantas micorrizadas pelos isolados 90A e RV82 de *Pisolithus* sp.

Quadro 14 – Concentração de N na parte aérea de mudas de *Eucalyptus grandis*, aos 90 dias de idade, não inoculadas (NM) ou inoculadas com *Pisolithus* sp., isolados 90A e RV82, ou *Laccaria laccata*, isolado ME46, em função de doses de N-NO₃⁻, N-NH₄⁺ ou N-NH₄⁺/NO₃⁻. Média de três repetições.

Doses de N mg kg ⁻¹	N-NO ₃ ⁻				N-NH ₄ ⁺				N-NH ₄ ⁺ /NO ₃ ⁻			
	NM	90A	RV82	ME46	NM	90A	RV82	ME46	NM	90A	RV82	ME46
	----- dag kg MS ⁻¹ -----											
50	1,46	1,62	1,64	1,34	0,95	0,89	1,26	1,52	1,33	1,43	1,12	1,49
75	1,33	nd	nd	1,39	1,26	nd	nd	1,33	0,92	0,47	0,99	1,31
100	1,40	1,38	1,13	1,39	0,18	nd	nd	1,35	0,76	1,22	1,44	1,23
200	1,07	1,06	nd	1,31	0,95	1,19	0,91	1,26	0,24	1,27	1,12	1,56

nd = não detectado

Quadro 15 – Análise de variância para concentração de N na parte aérea de mudas de *Eucalyptus grandis*, aos 90 dias de idade, não inoculadas (NM) ou inoculadas com *Pisolithus* sp., isolados 90A e RV82, ou *Laccaria laccata*, isolado ME46, em função de N-NO₃⁻, N-NH₄⁺ ou N-NH₄⁺/NO₃⁻. Média de três repetições.

FV	QM	F
NM VS MIC	0,99977890	8,011118847*
PT VS LAC	0,75214452	6,026851677*
90 VS RV82	0,01407963	0,112818533NS

NS = não significativo; * = significativo pelo teste F a 5% de probabilidade

Quadro 16 – Concentração de P na parte aérea de Mudanças de *Eucalyptus grandis*, aos 90 dias de idade, não inoculadas (NM) ou inoculadas com *Pisolithus* sp., isolados 90A e RV82, ou *Laccaria laccata*, isolado ME46, em função de doses de N-NO₃⁻, N-NH₄⁺ ou N-NH₄⁺/NO₃⁻. Média de três repetições.

Doses de N mg kg ⁻¹	N-NO ₃ ⁻				N-NH ₄ ⁺				N-NH ₄ ⁺ /NO ₃ ⁻			
	NM	90A	RV82	ME46	NM	90A	RV82	ME46	NM	90A	RV82	ME46
	----- dag kg MS ⁻¹ -----											
50	0,15	0,17	0,21	0,33	0,15	0,38	0,67	0,36	nd	0,30	0,22	0,32
75	nd	nd	nd	0,55	nd	nd	nd	0,63	nd	0,26	nd	0,40
100	0,07	0,05	0,15	0,19	0,07	nd	nd	nd	0,43	0,43	0,16	0,28
200	nd	0,11	0,20	0,39	0,30	0,24	0,43	nd	0,04	0,45	0,45	0,18

nd = não detectado

Quadro 17 – Análise de contrastes para concentração de P na parte aérea de *Eucalyptus grandis*, aos 90 dias de idade, não inoculadas (NM) ou inoculadas com *Pisolithus* sp., isolados 90A e RV82, ou *Laccaria laccata*, isolado ME46, em função de N-NO₃⁻, N-NH₄⁺ ou N-NH₄⁺/NO₃⁻.

FONTE DE N	NM	90A	RV82	ME46	Contrastes		
					C1	C2	C3
	----- dag kg MS ⁻¹ -----						
NO ₃ ⁻	0,13	0,14	0,28	0,39	NS	*	NS
NH ₄ ⁺	0,22	0,31	0,66	0,50	*	NS	*
NH ₄ ⁺ /NO ₃ ⁻	0,24	0,36	0,31	0,29	NS	NS	NS

Análise de contrastes ortogonais: C1 = NM VS Micorrizadas; C2 = *Pisolithus* sp. VS *L. laccata*; C3 = 90A VS RV82; NS = não significativo e * = significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Experimentos com *E. grandis*, inoculado com fungos micorrízicos, indicam que grande parte do P absorvido fica armazenado no manto fúngico, resultando em menor eficiência de utilização pelas plantas com micorrizas (AMORIM, 1988; COMERLATO, 1992). O P acumulado no manto fúngico pode ser liberado para as plantas, principalmente em condições de baixa disponibilidade desse nutriente (HEINRICH e PATRICK, 1986). Dados obtidos por HAWKINS (1999) mostraram que as concentrações de P na parte aérea de mudas *Triticum aestivum*, de foram menores em mudas sem micorrizas em relação às inoculadas com *Glomus mosseae*.

O baixo conteúdo de nutrientes, quando as plantas são crescidas em substratos com doses maiores de N mostra um efeito negativo do excesso de nitrogênio na absorção de nutrientes pela planta. MARSCHNER e DELL (1994) afirmam que os fungos micorrízicos promovem pequena contribuição na absorção de K e Ca, enquanto a sua contribuição para aquisição de Mg ainda não está muito clara. Dados obtidos por PEREIRA (1996) mostraram maior conteúdo de N e P na parte aérea das mudas de *E. grandis* quando inoculadas com fungos ectomicorrízicos, apresentando aumento linear até a maior dose de N aplicado. As plantas micorrizadas, apresentaram maior eficiência de utilização de N do que as plantas não-inoculadas.

Como NH_4^+ ou o NO_3^- compreendem cerca de 80% dos cátions e ânions absorvidos pela planta, a forma de nitrogênio aplicada tem um efeito inverso na absorção de outros cátions e ânions, na regulação do pH celular e no pH da rizosfera (MARSCHNER, 1995).

Acredita-se que a maior eficiência de utilização de N pelas plantas inoculadas possa ser devido à maior absorção deste nutriente pelo micélio fúngico, com posterior liberação deste para as raízes das plantas, aumento na capacidade de redução do nitrato, ou ainda, à melhor utilização de formas orgânicas de N no solo (FINLAY et al., 1989).

CONCLUSÕES

A eficiência de assimilação do nitrogênio pelos fungos ectomicorrízicos difere conforme o isolado fúngico e a fonte desse nitrogênio disponível no meio de crescimento. Isto deve-se a variações na capacidade de utilização de diferentes fontes de nitrogênio entre espécies e também entre isolados da mesma espécie.

A presença de ectomicorrizas altera a atividade das enzimas de assimilação de nitrogênio em mudas de *E. grandis*, de acordo com a fonte e a concentração do nitrogênio no substrato de crescimento, influenciando assim, na eficiência de utilização das diferentes formas de N pelas plantas.

A inoculação de plantas com fungos ectomicorrízicos promove maior produção de matéria seca e acúmulo de nutrientes, mas pode variar com a fonte e dose de N disponível e o fungo ectomicorrízico inoculado. No entanto, alta taxa de colonização não reflete em maior produção de biomassa.

A seleção de isolados fúngicos eficientes no processo de assimilação de nitrogênio, oferece grande benefício na produção de mudas em viveiros florestais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M. A. & ATTIWILL, P. M. Nitrate reductase activity and growth response of forest species to ammonium and nitrate sources of nitrogen. **Plant and Soil**. v.66, p.373-381, 1982.
- AHMAD, A. & ABDIN, M. Z. NADH: nitrate reductase na NADPH: nitrate reductase activities in mustard seedlings. **Plant Science**. v.143; p.1-8, 1999.
- AMORIM, E. F. C. **Comportamento de mudas de *Eucalyptus grandis* na presença de fungos endo e ectomicorrízicos**. Viçosa, UFV, 1988. 56p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 1988.
- BARROS, N. F. & NOVAIS, R. F. **Relação solo-eucalipto**. Ed. Folha de Viçosa, 1990. 330p.
- BARROS, N. F.; BRAGA, J. M.; BRANDI, R. M. & DEFILIPO, B. V. Produção de eucalipto em solos de cerrados em resposta á aplicação de NPK e de B e Zn. **Revista Árvore**, v. 5, p.90-103, 1981.
- BIGG, W. L. & DANIEL, T. W. Effects of nitrate, ammonium and pH on the growth of conifer seedlings and their production of nitrate reductase. **Plant and Soil**, v. 50, p. 371-385, 1978.
- BRAGA, M. J. , DEFELIPO, B. V. Determinação estectrofotométrica de fósforo em extratos de solo e material vegetal. **Revista Ceres**, v. 21 (113), p.73-85, 1974.
- BREMNER, J. M. & MULVANEY, C. S. Total nitrogen. In: PAGE, A.L.; MILLER, R. H.; KEENEY, D. R., ed. Methods of soil analysis – part 2 – chemical and

- microbiological properties. Madison, **American Society of Agronomy**, v. 2, p. 595-624, 1982.
- BOWEN, G. D. Mineral nutrition in ectomycorrhizae. In: ***Ectomycorrhizae*** (Ed. by MARKS, G. C. & KOSLOWSKI, T. T.) p. 151-205, Academic Press, New York, 1973.
- BOWEN, G. D. & SMITH, S. E. The effects of mycorrhizas on nitrogen uptake by plants. In: Terrestrial nitrogen cycles (Ed. By CLARK, F. E. & ROSSWALL, T.) **Ecological Bulletin Stockholm**, v. 33, p. 237-247, 1981.
- BURN, A., CHALOT, M., BOTTON, B. & MARTIN, F. Purification and characterization of glutamine synthetase and NADP-glutamate dehydrogenase from the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. **Plant Physiology**, v. 99, p. 938-941, 1992.
- CALDEIRA, M. T. M. **Interações metabólicas do nitrogênio e do enxofre em plantas de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex-Maiden**. Viçosa, UFV, 1988. 50p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição Mineral de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, 1988.
- CARRODUS, B. B. Absorption of nitrogen by mycorrhizal roots of beech. I. Factors affecting the assimilation of nitrogen. **The New Phytologist**, v. 65, p.358-371, 1966.
- CARRODUS, B. B. Absorption of nitrogen by mycorrhizal roots of beech. II. Ammonium and nitrate as sources of nitrogen. **The New Phytologist**, v. 66, p.1-4, 1967.
- CATALDO, D. A., SCHRADER, L. E. & YOUNG, V. L. Analysis by digestion and colorimetric assay of total nitrogen in plant tissues high in nitrate. **Crop Science**, v.14, p.854-856, 1974.
- CHALOT, M., STEWART, G. R., BRUN, A, MARTIN, F., BOTTON, B. Ammonium assimilation by spruce-*Hebeloma* sp ectomycorrhizas. **The New Phytologist**, v.199, p.541-550, 1991.
- CLARK, R. B. and BROWN, J. C. Differential phosphorus uptake by phosphorus stressed corn inbreds. **Crop Science**, v.14, p.505-508, 1974.
- CLARKE, A. L. & BARLEY, K. P. The uptake of nitrogen from soils in relation to solute diffusion. **Australian Journal of Soil Research**, v.6, p.75-88, 1968.
- COMERLATO, A G. **Determinação de especificidade e eficiência de fungos ectomicorrízicos para *Eucalyptus* spp.** Viçosa, UFV, 1992. 58p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 1992.
- COSTA, E. M. **Efeitos do alumínio, nitrato e amônio, sobre a nutrição nitrogenada em *Eucalyptus grandis* Hill (Maiden)**. Viçosa, UFV, 1986. 50p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição Mineral de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, 1986.

- COSTA, M. D. **Atividade biológica e liberação de nutrientes em resíduos da exploração de povoamentos de eucalipto**. Viçosa, UFV, 1995. 91p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 1995.
- CRAWFORD, N. M., WILKINSON, J. Q., LABRIE, S. J. Control of nitrate reduction on plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.19, p.377-385, 1992.
- DOUGALL, D. K. Evidence for the presence of glutamate synthase in extract of carrot cell cultures. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.58, p.693-694, 1974.
- FABRE, F. and PLANCHON, C. Nitrogen nutrition, yield and protein content in soybean. **Plant Science**, v.152; p.51-58, 2000.
- FINLAY, R. D.; Ek, H.; ODHAM, G. & SÖDERSTRÖM, B. Mycelial uptake, translocation and assimilation of nitrogen from ¹⁵N-labelled ammonium by *Pinus sylvestris* plants infected with four different ectomycorrhizal fungi. **The New Phytologist**, v.110, p.59-66, 1988.
- FINLAY, R. D.; Ek, H.; ODHAM, G. & SÖDERSTRÖM, B. Uptake, translocation and assimilation of nitrogen from ¹⁵N-labelled ammonium and nitrate sources by intact ectomycorrhizal systems of *Fagus sylvatica* infected with *Paxillus involutus*. **The New Phytologist**, v.113, p. 47-55, 1989.
- FINLAY, R. D.; FROSTEGARD, A. & SONNERFELDT, A. M. Utilization of organic and inorganic nitrogen sources by ectomycorrhizal fungi in pure culture and in symbiosis with *Pinus contorta* Dougl. Ex Loud. **The New Phytologist**, v.120, p.105-115, 1992.
- FORDE, B. G. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1465, p. 219-235, 2000.
- FRANCE, R. C. & REID, C. P. P. Interactions in nitrogen and carbon in the physiology of ectomycorrhizae. **Canadian Journal of Botany**, v. 61, p.964-984, 1983.
- GENETET, L.; MARTIN, F. & STEWART, G. Nitrogen assimilation in mycorrhizas. Ammonia assimilation in the N-starved ectomycorrhizal fungus *Cenococcum graniforme*. **Plant Physiology**, v.76, p.395-399, 1984.
- GIOVANNETTI, M. & MOSSE, B. Evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular infection in roots. **The New Phytologist**, v.84, p.489-500, 1980.
- GRIFFIN, D. F. **Fungal Physiology**, 2. Ed. New York: Wiley-Liss, 1994. 458p.
- HARLEY, J. L. Incorporation of carbon dioxide into excised beech mycorrhizas in the presence and absence of ammonia. **The New Phytologist**, v.63, p.203-208, 1964.

- HARLEY, J. L. & SMITH, S. E. **Mycorrhizal Symbiosis**. Academic press. London, 1983, 483p.
- HAWKINS, H. J. & GEORGE, E. Effect of plant nitrogen status on the contribution of arbuscular mycorrhizal hyphae to plant nitrogen uptake. **Physiologia Plantarum**, v.105, p.694-700, 1999.
- HO, I. & TRAPPE, J. M. Nitrate reductase activity of nonmycorrhizal Douglas Fir rootlets and some associated mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, v.54, p.395-398, 1980.
- HEINRICH, P. A. & PATRICK, J. W. Phosphorus acquisition in soil-root system of *Eucalyptus pilularis* Smith seedlings. II. The effects of ectomycorrhizas on seedlings phosphorus and dry weight acquisition. **Australian Journal of Botany**, v.34, p.445-454, 1986.
- HENRIQUES, A. B. **Absorção e assimilação de nitrogênio em *Pinus caribaea* var. *hondurensis* em associação micorrízica com *Pisolithus tinctorius***. Viçosa, UFV, 1991. 72p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, 1991.
- IETSWAART, T., SCHNEIDER, P. J., PRINS, R. A. Utilization of organic nitrogen sources by two phytoplankton species and a bacterial isolate in pure and mixed cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.1554-1560, 1994.
- JAWORSKI, E. G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.43, p.1274-1279, 1971.
- JENTSCHKE, G., MARSCHNER, P., VODNIK, D., MARTH, C., BREDEMEIER, M., RAPP, C., FRITZ, E., GOGALA, N & GODBOLD, D. L. Lead uptake by *Picea abies* Seedlings: Effects of Nitrogen Source and Mycorrhizas. **Journal of Plant Physiology**, v.153, p.97-104, 1998.
- KAISER, J. J. & LEWIS, O. A. M. Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in leaves and roots of nitrate-fed *Helianthus annuus* L. **Plant and Soil**, v.70, p.127-130, 1984.
- KOTTKE, L. Effects of nitrogen in forests on root production, root system and mycorrhizal state. In: KRAIGHER, H., BATIC, F., HANKE, D. E., AGERER, R., GRILL, D. (Eds.), **Proceedings of the International Colloquium on Bioindication of Forest Site Pollution: Development of Methodology and Training**, Tempus M-JEP 04667, Slovenian Forestry Institute, Ljubljana, p.107-111, 1995.
- KRAJINA, V.J.; MADOC-JONES, S.; MELLOR, G. Ammonium and nitrate in the nitrogen economy of some conifers growing in Douglas-fir communities of Pacific North-West of America. **Soil Biology and Biochemistry**, v.5, p.143-147, 1973.

- LAIHO, O. *Paxillus involutus* as a mycorrhizal symbiont of forest trees. **Acta Forestalia Fennica**, v.106, p.1-65, 1970.
- LAWRENCE, J. M. & HERRICK, H. E. Media for "in vivo" nitrate reductase assay of plant tissues. **Plant Science Letter**, v.24, p.17-26, 1982.
- LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. **Principles of Biochemistry**. New York: Worth Publishers, 1993. 1013p.
- LOCATTELLI, M. 1984. **Efeito de formas, fontes e doses de nitrogênio sobre o crescimento e composição mineral de mudas de *Eucalyptus grandis* W. Hill (ex Maden. Viçosa, UFV, 1984. 64p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição Mineral de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, 1984.**
- LUNDEBERG, G. Utilization of various nitrogen sources, in particular bound soil nitrogen, by mycorrhizal fungi. **Studia Forestalia Suecica**, v.79, p.1-95, 1970.
- MANTOVANI, H. C. **Assimilação de diferentes fontes de nitrogênio por *Humicola* sp. Viçosa, UFV, 1996. 79p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 1996.**
- MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. Academic Press. London, 1995, 889p.
- MARTIN, F. ¹⁵N-NMR studies of nitrogen assimilation and amino acid biosynthesis in the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum graniforme*. **FEBS Letters**, v.182, p.350-354, 1985.
- MARTIN, F.; RAMSTEDT, M. & SÖNDERHÄLL, K. Carbon and nitrogen metabolism in ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. **Biochemic**, v.69, p.569-581, 1987.
- MARTIN, F.; STEWART, G.; GENETET, L. & LE TACON, F. Assimilation of ¹⁵NH₄⁺ by beech (*Fagus sylvatica* L.) ectomycorrhizas. **The New Phytologist**, v.102, p.85-94, 1986.
- MARTIN, F., STEWART, G. R., GENETET, I., MOUROT, B. The involvement of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in ammonia assimilation by a rapidly growing ectomycorrhizal ascomycete, *Cenococcum geophilum* Fr. **The New Phytologist**, v.110, p.541-550, 1988.
- MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on tree resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathology**, v.59, p.153-163, 1969.
- MELIN, E. & NILSSON, H. Transport of labelled nitrogen from an ammonium source to pine seedlings through mycorrhizal mycelium. **Svensk Botanisk Tidskrift**, 46: 281-285, 1952.

- MELIN, E. & NILSSON, H. Transfer of labelled nitrogen from glutamic acid to pine seedlings through the mycelium of *Boletus variegatus* (Sw.) Fr. **Nature**, v.171, p.134, 1953.
- MENDONÇA, L. F. **Seleção de fungos ectomicorrízicos para utilização em programas de inoculação controlada em *Pinus caribaea*. Competitividade e níveis de fósforo no solo.** Viçosa, UFV, 1991. 60p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 1991.
- MOORE, C.W.E. & KERAITIS, K. Effect of nitrogen source on growth of *Eucalyptus* in sand culture. **Australian Journal of Botany.**, v.19, p.125-141, 1971.
- NESSELHUT, T. & HARNISCHFEGER, G. Characterization of glutamine-synthetase from *Beta vulgaris*. **Physiologia Plantarum**, v.51, p.329-334, 1981.
- NOVAIS, R. F.; RÊGO, A. K. & GOMES, J. M. Nível crítico de potássio no solo e na planta para o crescimento de mudas de *Eucalyptus grandis* W. Hill (ex Maden) e de *Eucalyptus cloeziana* F.Muell. **Revista Árvore**, v.4, p.14-23, 1980.
- OAKS, A.; STULEN, J.; JONES, K.; WINSPEAR, M. J.; MISRA, S.; BOESEL, I.J. Enzymes of nitrogen assimilation in maize roots. **Planta**, v.148, p.477-484, 1980.
- PATE, J. S. Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v.5, p.109-119, 1973.
- PEREIRA, J. M. **Atividade da redutase do nitrato e associação ectomicorrizica em mudas de *Eucalyptus grandis* em resposta ao nitrato.** Viçosa, UFV, 1993. 70p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 1993.
- PEUKE, A. D. & KAISER, M. W. Nitrate or ammonium uptake and transport, and rapid regulation of nitrate reduction in higher plants. **Progressing Botany**, v.57, p.93-113, 1996.
- PUTRA, D. P., BERREDJEM, A., CHALOT, M., DELL, B. & BOTTON, B. Growth characteristics, nitrogen uptake and enzyme activities of the nitrate-utilizing ectomycorrhizal *Scleroderma verrucosum*. **Mycological Research**, v.103 (8), p.997-1002, 1999.
- RATAJCZAK, L.; RATAJCZAK, W.; MAZUROWA, H. The effect of different carbon and nitrogen sources on the activity of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in lupine embryonic axes. **Physiologia Plantarum**, v.51, p.277-280, 1981.
- ROLLINS, M. J., GAUCHER, G. M. Ammonium repression of antibiotic and intracellular proteinase production in *Penicillium urticae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.41, p.447-455, 1994.

- RUNGE, M. Physiology and ecology of nitrogen nutrition. In: LANGE, O.L., NOBEL, P.S., OSMOND, C.B., ZEIGLER, H. (Eds.). **Encyclopedia of Plant Physiology**, New Series, 12C. Springer-Verlag, Berlin, p.163-200, 1983.
- RUDAWSKA, M., KIELISZEWSKA-ROKICHA, B., DEBAUD, J. C., LEWANDOWSKI, A., GAY, A. Enzymes of ammonium metabolism in ectendomycorrhizal and ectomycorrhizal symbionts of pine. **Physiologia Plantarum**, v.92, p.279-285, 1994.
- SARJALA, T. Effect of nitrate and ammonium concentration on nitrate reductase activity in five species of mycorrhizal fungi. **Physiologia Plantarum**, v.70, p.65-70, 1990.
- SCHWALBE, M., TELLER, S., OELMULLER, R. & APPENROTH, K Influence of UVB irradiation on nitrate and ammonium assimilating enzymes in *Spirodela polyrhiza*. **Aquatic Botany**, v.64; p.19-34, 1999.
- SCHEROMM, P., PLASSARD, C. & SALSAC, L. Regulation of nitrate reductase in the ectomycorrhizal basidiomycete, *Hebeloma cylindrosporium* Romagn, cultured on nitrate or ammonium. **The New Phytologist**, 114:441-447, 1990.
- SCHREIER, H. J., SMITH, T. M., BERNLOHR, R. W. Regulation of nitrogen catabolic enzymes in *Bacillus* spp. **Journal of Bacteriology**, v.151, p.971-975, 1982.
- SILVA, E.R. **Assimilação de nitrogênio inorgânico por *Pisolithus tinctorius***. Viçosa, UFV, 1996. 42p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- THOMAS, F.M. & HILKER C. Nitrate reduction in leaves and roots of young pedunculate oaks (*Quercus robur*) growing on different nitrate concentrations. **Environmental and Experimental Botany**, v.43; p.19-32, 2000.
- TYLER, B. Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. **Annual Review of Biochemistry**, v.47, p.1127-1162, 1978.
- VALE, F. R.; NOVAIS, R. F.; BARROS, N. F. & SANT'ANNA, R. Efeito do alumínio sobre a cinética de absorção de amônio e nitrato em raízes intactas de *Eucalyptus alba*. **Revista Árvore**, v.8; p.123-132, 1984.
- VARAVALLO, M. A. **Assimilação de nitrogênio inorgânico por fungos ectomicorrizicos**. Viçosa, UFV, 1998. 31p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- VÉZINA, L. P., MARGOLIS, H. A. & DELANEY, S. Changes in the activity of enzymes involved with primary nitrogen metabolism due to ectomycorrhizal symbiosis of jack pine seedlings. **Physiologia Plantarum**, v.75, p.55-62, 1989.

VÉZINA, L. P., MARGOLIS, H. A. & QUIMET, R. The activity, characterization and distribution of the nitrogen assimilation enzyme, glutamine synthetase, in jack pine seedlings. **Tree Physiology**, v.4, p.109-118, 1988.