**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA DEPRESSÃO DE CRESCIMENTO DE
PORTA-ENXERTOS CÍTRICOS INOCULADOS COM FUNGO MICORRÍZICO
ARBUSCULAR EM DOSES ALTAS DE FOSFATO**

JOSÉ OZINALDO ALVES DE SENA
Engenheiro Agrônomo

Orientadora Profª. Dra. **ELKE J. B. N. CARDOSO**

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Doutor em
Agronomia, Área de Concentração: Solos e
Nutrição de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Julho - 1998

Página	Linha	Onde se lê	Leia-se
iii	6, 7 e 8	voce e sua (com referência a Jesus)	Você e Sua
viii	2	ΦOpen PSII	Φ _{open}
xii	18	(SuSv)	(SS) (válido para todas as páginas)
xv	6	Professor Adjunto IV	Professor
	8	Fisiologia e Ecologia de Plantas	Fisiologia Ecológica de Plantas
xvi	11 e 12	Instalou-se, cultivou-se	instalaram-se, cultivaram-se
	12	Citrus	Citrus
	12	Citrus limonia	Citrus limonia (Itálico)
	12	Limoeiro Cravo	limoeiro (Cravo, também pag. 31)
	12 e 13	Tangerineira Cleopatra	tangerineira "Cleopatra" (também pag. 31)
	13	Citrus reshni	Citrus reshni (Itálico)
	15	mg kg ⁻¹	mg kg ⁻¹ (válido para todas as páginas)
	15	(Experimento 1)	(Experimentos 1 e 2)
	15	Kg-l	Kg
	16	Ou com	Eliminar ou com
	16	Kg-l	kg
	16	(Experimento 2)	(Experimento 3), (25, 50, 150, 250 e 500 mg kg ⁻¹) (Experimento 4) e (0, 50, 100, 150, 200, 250 mg kg ⁻¹) (Experimento 5)
	21	(Experimento 1) e	(Experimento 1)
	21	(Experimento 2)	(Experimento 2, 3, 4 e 5) e três repetições (Experimento 6)
	25	ΦOpen PSII	Φ _{open}
xvii	4	pode ser explicada	pode ser explicada parcialmente
	7	SPS	SPS (Sacarose Fosfato Sintase)
xviii	11	Limoeiro Cravo	limoeiro "Cravo"
	11	Citrus	Citrus
	11 e 12	Citrus limonia	Citrus limonia (Itálico)
	12	Tangerineira Cleopatra	tangerineira "Cleopatra"
	12	Citrus reshni	Citrus reshni (Itálico)
	15	(Experimento 1)	(Experiments 1 e 2)
	15	Kg-l	Kg
	16	(Experimento 2)	(Experiment 3), (25, 50, 150, 250 e 500 mg kg ⁻¹) (Experiment 4) e (0, 50, 100, 150, 200, 250 mg kg ⁻¹) (Experiment 5)
	24	ΦOpen PSII	Φ _{open}
xix	3	can be explained	can be partially explained
1	14	aunda e,	aunda e
2	3	(adubos e agrotóxicos)	(adubos e defensivos)
	7	in vitro	in vitro
	11	Melhoramento de plantas como	melhoramento de plantas
	15 e 16	Essa "depressão de crescimento" em plantas micorrizadas, e explicada por algumas hipóteses via foliar.	Para explicar essa "depressão de crescimento" em plantas micorrizadas, algumas hipóteses têm sido propostas via foliar
4	11	Os açúcares tanto em alta concentração,	Os açúcares, em alta concentração
5	10	como favorecer,	ou favorecer.
	13	Ppm	mudou para mg kg ⁻¹
6	2	β-1,3-endoglucanases	β-1,3-endoglucanases
	3	do fungo	do fungo
8	24	Usitatissimum, L.	usitatissimum, L.
9	25	Requerido, usando °C, apresentam valores entre 4	requerido apresenta valores entre 4
10	13	Não observou-se	Não se observou
	7	Crescimento,	Crescimento
	9	Verificada,	Verificada
	11	de citros	de citros
	15	Micorrizico	Micorrizico
11	18	CO ₂	CO ₂
12	14	Carbono, significa	carbono significa
13	25 e 26	Açúcares solúveis, sacarose,	açúcares solúveis, incluindo sacarose,
14	4	a disposição	a disposição
	10	que	que
	29	Kinase	quinase (correção válida para todas as páginas)
16	14	(Sacarose Fosfato Sintase)	(Sacarose Fosfato Sintase)
	13	há indicação	há indicação
17	5	Carga	"carregamento" (válido para demais páginas)
	9	"descarga"	"descarregamento" (válido para demais páginas)
18	26	que,	que
19	1	maduros e,	maduros e
20	18	assimilados	assimilados
23	14	verdadeiro, se	verdadeiro se
	15	saturante e o receptor	saturante e o receptor
25	12	Pi, a	Pi a
27	9	maiores em	maiores do que em
31	7 e 8	Laranja caipira	laranjeira "Caipira"
	21	mg kg ⁻¹	mg kg ⁻¹
32	13	Fluorímetros	fluorômetros
	15	medição da	medição da
	18	anteriormente	anteriormente
33	2	3.1.2 EXPERIMENTO 2	3.2 EXPERIMENTO 3
	8	saturação de bases	saturação por bases
34	Tabela 1	Experimento 1	Experimentos 1-5
	Tabela 1	Experimento 2	Experimento 6
	Tabela 1	Catões e Teores	eliminar as palavras Catões e Teores da coluna Características
35	22	(1 e 5 cm ⁻¹)	(1 e 5 mm ⁻¹)
36	12	1 M	½ mol L ⁻¹
	19	3.3 EXPERIMENTO 3	3.3 EXPERIMENTO 2
	20	O Experimento 3	O Experimento 2
	21	Experimento 2	Experimento 1
	25	4. Diâmetro de entre-nos	4. Distância de internódios
38	18	as taxas	as taxas
39	Figura 13	DISTANCIA DE ENTRE-NOS	DISTANCIA DE INTERNODIOS
	5	Departamento de Botânica	Departamento de Fisiologia Ecológica de Plantas
40	15	raízes	raízes
42	1	Fotômetro	Espectrofotômetro (válido para demais páginas)
	4	Glicose	Glicose
	7	onde se usaram	onde usou-se
	18	ajuste do pH do extrato	ajuste do pH do extrato para 4.6
	20	ácido acético 100 mM	ácido acético 100 mM
44	1	Figura 17. Esquema de reação. Pi	Passar legenda para página 43
	6	usaram-se	usou-se
	16	usaram-se	usou-se
46	10	Vmax	Vmax
49	8	altas de P	altas de P. As figuras a serem apresentadas foram definidas como o conjunto de gráfico com análise de regressão mais tabela com teste de médias
52	7	590 mg kg ⁻¹ , enquanto que, para 360 mg de P kg ⁻¹	590 mg kg ⁻¹
58	11	(Figura 28 A)	(Figura 28 A)
	16	dose de P	dose do elemento
62	Figura 30 A-D	Apresenta tabela com teste de média para análise de fotossíntese	Eliminar a tabela (repetição da página 64)
67	1	arbuscular e	arbuscular foi
69	7	sistema micorrizado	sistema micorrizado (dados não apresentados)
72	13	maior superavit	maior concentração
73	3	foliares de P.	foliares do elemento
74	2	P	P
76	7	P (200)	P (50)
77	11	parede celular da célula	parede da célula
84	Legenda Fig. 47	superior superior	superior
88		Fotoassimilados explica	fotoassimilados explica parcialmente
91	19	O2	O ₂
93	21	Inorgânico	inorganic
100	9	growth depression	growth depression
100	17	Relations	relations

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Sena, José Ozinaldo Alves de

Caracterização bioquímica da depressão de crescimento de porta-enxertos cítricos inoculados com fungo micorrízico arbuscular e cultivados com doses altas de fosfato / José Ozinaldo Alves de Sena. - - Piracicaba, 1998.

111 p. : il.

Tese (doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1998.
Bibliografia.

1. Citricultura 2. Enzima vegetal 3. Fluorescência 4. Fósforo 5. Fotossíntese 6. Fungo micorrízico 7. Porta-enxerto I. Título

CDD 634.3

"...Então quem pode me separar do amor de Cristo? Serão os sofrimentos, as dificuldades, a perseguição, a fome, a pobreza, o perigo ou a morte? ...Em tudo tenho a vitória por meio daquele que me amou. Em todo o universo não há nada que possa me separar do amor de Deus, que é meu por meio de Cristo Jesus, o meu Senhor."

(Romanos 8.35-39)

JESUS obrigado pelo infinitamente mais que você tem feito em mim e através de mim (Efésios 3.17-21). Obrigado pela certeza de que tudo sem você seria nada e que nada nem ninguém vai me separar do seu amor. Os caminhos que ainda vou percorrer, já foram ou serão antes percorridos por você. Você é o único digno de receber toda honra, louvor, adoração, poder, riqueza, sabedoria e força (Apocalipse.5.13)

Essa tese é sua, consagrada a você.

DEDICO

Aos meus queridos pais **ARTUR e MARIA DAS DORES ALVES DE SENA,**

In memoriam: Fines coronat opus. Ab imo pectore

Aos manos **EDNALDO, ROBERTO, ARTUR, GERALDO E MARIA DE LOURDES,** partícipes nas minhas lutas e vitórias. Como é gostoso e confortante saber que vocês existem, me amam e me admiram tanto!

A **HUMBERTO ACTIS ZAIDAN,** o amigo que vi nascer de novo e frutificar; tornou-se meu irmão e tem sido bênção em minha vida e útil para o propósito do senhor Jesus nessa geração.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá/Departamento de Agronomia, pela oportunidade de treinamento;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), programa PICD, pelo auxílio concedido através da bolsa de estudo;

À CAPES/DAAD-PROBRAL, pelo doutorado “sanduiche” na Alemanha;

À FAPESP, pelos recursos destinados ao projeto de pesquisa temático FAPESP 93/3553-5;

À Dra. Elke J. B. N. Cardoso por ter sido responsável oficialmente pela minha pessoa frente ao Curso de Pós Graduação em Solos e Nutrição de Plantas e pela oportunidade de treinamento na Alemanha. A palavra “você está no lugar certo” foi muito especial para mim. Confesso que aprendi e cresci;

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate, a quem procurei interessado em estudar estresse em plantas e me introduziu no Departamento de Solos. Minha admiração pela sua capacidade de trabalho e seriedade profissional. Foi no seu laboratório que desenvolvi a maior parte dos dados obtidos no Brasil;

Ao prof. Márcio M. Lambais pela amizade e incentivos;

Aos técnicos do laboratório de Solos Luiz Fernando Baldesin e Denise L. C. Mescolotti, pela amizade, incentivo e apoio;

À Ivany Rodrigues da Silva que investiu e acreditou em mim e que me desafiou, na prática, a crer no impossível e a ousar profetisar, em nome de Jesus, vida ao caos e libertação aos cativos. A sua família (Júnior, Luciana e Juliana) são muito especiais para mim;

Ao querido Humberto Actis Zaidan pelas horas, muitas noites, noites a dentro em momentos tão decisivos... É impagável;

A Antônio Pancrácio Souza (Little Tony) pelas tantas horas investidas em meu favor. Estou certo que retornará em bênçãos para sua vida;

A todos da Aliança Bíblica Universitária (ABU/ESALQ/USP): Alessandra, Ana lúcia (Lú), Alexandre, Antonio (Little Tony), Cássio, Daniel Morales, Daniel , Deni Gleise (Deni), Edvane (Didi), Elisabeth, Eliana, Éclison, Gustavo (Gugu), Humberto, Ilza, Leonardo (Léo), Livia, Maria Cecília (Ciça), Marcos, Mateus, Patrícia, Pedro, Regina (Ré), Rogério, Tiago. Vocês marcaram muito a minha vida. Obrigado pelo amor, carinho, intercessão. Não há como esquecer tudo o que vivemos juntos;

(Estudo Bíblico – Gramadão da ESALQ)

Aos amados irmãos da Igreja Batista Memorial, em Maringá, pelo carinho e intercessão em meu favor. Em Ophir e Joana, meus pastores, a lembrança de um Deus que não desiste de amar;

À Comunidade Evangélica em Piracicaba (Jupia), na pessoa dos seus líderes Rubinho, Joelson, Nivaldo e Osvaldo, pelo carinho e intercessão. Estar aliado com esses amados foi para mim mais que um doutorado;

A Maurício, Silvinha, meus discipuladores, e os filhos Pedro Henrique e Fabrício, pelo carinho e constante intercessão em meu favor. Tem sido prazeroso caminharmos juntos;

Aos inesquecíveis amigos e irmãos em Cristo Pedro Emiliano (São Paulo) e Reginaldo Bispo (Campina Grande, Paraíba), que partiram de forma tão prematura e em meio a tantos sonhos. Alegro-me na certeza de que vocês estão em Jesus e conheceram a

eternidade desde aqui. Um dia estaremos juntos num mundo onde não haverá mais partidas, choros, tristezas, nem dor...onde o Senhor Jesus tirará dos nossos olhos toda a lágrima;

Ao amigo e irmão Daniel Farfan pelo trabalho de computação gráfica, feito com tanto amor. À Patrícia Simões e Silvana S. Cardoso pelos serviços prestados e pelo carinho;

Denise Malafaia, Jurema, Maria, Shin, Keiko verdadeiros tesouros em vasos de barro. Quanto carinho e dedicação;

À Sueli, que vi crescer na graça e no conhecimento do Senhor Jesus, pelo altruísmo e prontidão no servir. À sua família (Valter, Júnior e Hugo) o meu carinho;

A Edson e Silvia, Germán, Victor e Ana Paula, Neide, amigos brasileiros em Tübingen, Alemanha, sementes semeadas em meio à tempestades, frutos colhidos em alegria;

Aos amigos Arnaldo Colozzi-Filho, Rogério Melloni, Vânia Gomes, Marco Antonio Oliveira, Heron Salazar pela amizade e apoio;

(Tübingen, Alemanha. Foto tirada num dia ensolarado de março/98)

Ao Prof. Dr. Rüdiger Hampp pelo treinamento no Instituto de Fisiologia Ecológica, Universidade de Tübingen, Alemanha, pelas sugestões e apoio em todos os momentos;

Ao Prof. Dr. Werner Einig pela orientação muito especial e amizade;

Aos amigos, Margret, Marion, Gabriel, Manfred, Martin, Heinke, Anja, Barbara, Lanbo, Xuemei, Achim, Leni, do Instituto de Fisiologia Ecológica, Tübingen, o meu carinho. Foram muito especiais;

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xiv
CURRICULUM VITAE.....	xv
RESUMO.....	xvi
SUMMARY.....	xviii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Colonização radicular e fosfato.....	4
2.2 Depressão de crescimento: definição e ocorrência.....	6
2.3. Metabolismo de carboidratos e atividade enzimática.....	12
2.4. Fluorescência da clorofila e taxas de fotossíntese.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Experimento 1.....	31
3.2 Experimento 2.....	33
3.3 Experimento 3.....	36
3.4 Experimento 4 e 5.....	38
3.5 Experimento 6.....	39
3.6 Análise estatística.....	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1 Experimentos 1, 2, 3, 4 e 5	49
4.1.1 Alturas de plantas.....	49
4.1.2 Massa seca da parte aérea.....	50
4.1.3 Área foliar.....	53
4.1.4 Distância de internódios	54
4.1.5 Colonização radicular interna e micélio extrarradicular interno.....	55

4.1.6 Transpiração e resistência estomática.....	58
4.1.7 Fluorescência da clorofila a (Φ Open PSII).....	60
4.1.8 Taxas de fotossíntese.....	63
4.2 Experimento 6.....	66
4.2.1 Altura de plantas, massa fresca da parte aérea, relação parte aérea/raiz e assimilação do CO ₂	66
4.2.2 Glicose, frutose e sacarose nas folhas e raízes.....	69
4.2.3 Amido nas folhas e raízes.....	72
4.2.4 Fósforo inorgânico nas folhas e raízes.....	72
4.2.5 Sacarose sintase e invertase nas raízes.....	75
4.2.6 Sacarose sintase nas folhas.....	79
4.2.7 Sacarose fosfato sintase.....	80
4.2.8 Grau de ativação de SPS.....	81
5 CONCLUSÕES.....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

LISTA DE FIGURAS

Página

1	Regulação da síntese de sacarose e amido em folhas.....	15
2	Regulação de SPS por fosforilação/desfosforilação de proteínas.....	16
3	Síntese e hidrólise de sacarose em folha.....	17
4	Regulação de invertases por hexoses.....	19
5	Modelo de metabolismo da sacarose em raízes.....	21
6	Reações de Hill, a fosforilação fotossintética (luminosas) e a fixação e redução do CO ₂ (no escuro).....	23
7	Transporte de elétrons, geração de ATP e NADPH ₂ e fixação do CO ₂ no cloroplasto.....	26
8	Regulação de crescimento mediada por hexose e invertase ácida.....	29
9	Expressão de genes modulados por carboidratos.....	30
10	Representação gráfica dos parâmetros de fluorescência da clorofila a, F ₀ e F _M	33
11	Eletrodo de O ₂ e aparelho marca Hansatech para calibração e recepção de impulsos elétricos. Registro de dados.....	37

12	Base química do uso da liberação de O_2 para estimar taxa de fotossíntese.....	38
13	Resumo geral da metodologia dos experimentos 1, 2, 3, 4, e 5.....	39
14	Detalhes do Experimento 6.....	41
15	Esquema de reação que fundamentou a análise enzimática de glicose, frutose e sacarose.....	42
16	Esquema de reação que fundamentou a análise enzimática de amido.....	43
17	Esquema de reação que fundamentou a análise de P_i	43
18	Esquema de reação que fundamentou a análise enzimática de sacarose sintase.....	44
19	Esquema de reação que fundamentou a análise enzimática de invertase.....	45
20	Esquema de reação que fundamentou a análise enzimática de sacarose fosfato sintase	46
21	Resumo geral da metodologia apresentada para o experimento 6.....	48
22	A-B Alturas de porta-enxerto cítrico (tangerina cleópatra), em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 4 repetições.....	51
23	Massa seca da parte aérea para tangerina Cleópatra, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 5 repetições.....	52

24	Área foliar para tangerina Cleópatra, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 4 repetições.....	54
25	Distância de internódios para tangerina Cleópatra, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 4 repetições.....	55
26	A-B Colonização radicular interna para tangerina Cleópatra colonizado com FMA, em função doses de P. Média de 3 repetições	56
27	A-B Comprimento de micélio extrarradicular ativo para tangerina cleópatra, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 3 repetições.....	57
28	A-B Transpiração e resistência estomática para tangerina Cleópatra, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 4 repetições	59
29	A-B ϕ_P^{open} para tangerina Cleópatra, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 4 repetições	61
30	A-D ϕ_P^{open} para tangerina Cleópatra, no tempo, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 4 repetições	62
31	A-D Taxas de fotossíntese e respiração no escuro (dark respiration) para tangerina Cleópatra e limão cravo, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 4 repetições	64
32	A-B Taxas de fotossíntese (liberação de O_2) e respiração no escuro (dark respiration) para limão cravo, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 4 repetições	65

33 A-B	Altura e massa fresca da parte aérea para limão cravo, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 3 repetições	67
34 A-D	Taxa de fotossíntese (assimilação de CO ₂) e respiração no escuro (dark respiration) para limão cravo, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 3 repetições	68
35	Concentrações de glicose nas folhas e raízes de limão cravo, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 3 repetições	69
36 A-B	Concentrações de frutose nas folhas e raízes de limão cravo, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 3 repetições	70
37 A-B	Concentrações de sacarose nas folhas e raízes de limão cravo, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 3 repetições	71
38 A-B	Concentrações de amido nas folhas e raízes de limão cravo, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 3 repetições	73
39 A-B	Concentrações de fósforo inorgânico em folhas e raízes de limão cravo, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 3 repetições	74
40	Disponibilidade de P em substrato cultivado com limão cravo, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 3 repetições	75
41	Concentrações de sacarose sintase (SuSy) em raízes de limão cravo, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 3 repetições	76

42 A-C	Concentrações de invertase em raízes de limão cravo, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 3 repetições	78
43 A-B	Atividade de invertase em raízes de limão cravo, em função da inoculação ou não com FMA e pH. Média de 3 repetições	79
44	Atividade de sacarose sintase em folhas de limão cravo, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 3 repetições	80
45 A-B	Concentrações de sacarose fosfato sintase (SPS) em folhas de limão cravo, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 3 repetições	81
46 A-B	Atividades de sacarose fosfato sintase (SPS) (folhas), em função de níveis de frutose-6-P e glicose-6-P. Média de 3 repetições	82
47 A-B	Regulação da síntese de sacarose e amido em folha (esquema superior) e raízes (esquema inferior) de planta micorrizada	84
48	Proposta para explicar a depressão de crescimento em mudas de citros micorrizadas em doses altas de fosfato, considerando-se a interação P-metais nas raízes e desbalanço hormonal como desencadeadores do fenômeno	86

LISTA DE TABELAS

Página

- 1 Características químicas dos substratos usados nos experimentos..... 34
- 2 Características químicas do super fosfato triplo (SFT) utilizado no experimento. 35
- 3 Km e Vmax para Fru-6-P em presença de diferentes concentrações do ativador
alostérico Glic-6-P, usando amostras de tecido foliar de citros com e sem fungo
micorrízico arbuscular e 800 mg kg⁻¹ de P. Média de 3 repetições..... 83

CURRICULUM VITAE

JOSÉ OZINALDO ALVES DE SENA

Nascido a 23 de julho de 1957, em João Pessoa, Paraíba;

Formado em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal da Paraíba, Campus de Ciências Agrárias, Areia, Paraíba (1976-1981);

Mestre em Agronomia, área de concentração Fertilidade do Solo, pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Solos (1982-1985);

Professor Adjunto IV da Universidade Estadual de Maringá, Paraná desde 1985;

Especialista em Solos Tropicais pela ABEAS (1989);

Doutorado “sanduiche” no Instituto de Fisiologia e Ecologia de Plantas, Departamento de Botânica, Universidade de Tübingen, Alemanha (1997-1998);

Doutor em Agronomia, Área de Concentração Solos e Nutrição de Plantas, pela ESALQ/USP (1995-1998).

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA DEPRESSÃO DE CRESCIMENTO DE PORTA-ENXERTOS CÍTRICOS INOCULADOS COM FUNGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR EM DOSES ALTAS DE FOSFATO

Autor: JOSÉ OZINALDO ALVES DE SENA

Orientadora: Profa. Dra. ELKE J. B. N. CARDOSO

RESUMO

Algumas espécies vegetais apresentam quando micorrizadas, e em níveis altos de fósforo disponível no solo ou substrato, depressão no crescimento, inclusive quando cultivadas a campo. Este fenômeno pode ser devido ou estar relacionado a alteração das taxas de fotossíntese e de utilização de carboidratos da planta hospedeira. Com o objetivo de testar essa hipótese, instalou-se experimentos em casa de vegetação, onde cultivou-se porta-enxertos cítricos Limoeiro Cravo (*Citrus limonia* (L.) Osbeck) e Tangerineira Cleópatra (*Citrus reshni* Hort. ex Tanaka). Os porta-enxertos foram inoculados ou não com Fungo Micorrízico Arbuscular (FMA) (*Glomus intraradices* Schenck & Smith) e cultivados com diferentes doses de P (0, 200, 400, 600 e 800 mg kg⁻¹) (Experimento 1) ou com (50, 200, 400 e 800 mg kg⁻¹) (Experimento 2). Usou-se como substrato uma mistura de solo arenoso + areia, na proporção de 3:1, previamente corrigido com calcário dolomítico e autoclavado. Adicionalmente às doses de P os porta-enxertos foram adubados com N (80 mg kg⁻¹; NH₄NO₃) e micronutrientes (-Mn). O experimento foi instalado de acordo com delineamento estatístico fatorial inteiramente casualizado e usou-se cinco repetições (Experimento 1) e quatro repetições (Experimento 2). Seis meses após o transplântio, as plantas foram colhidas avaliadas e analisadas. Como variáveis de resposta estudou-se: altura de plantas, massa seca ou fresca da parte aérea, massa fresca de raízes, relação parte aérea/raiz, transpiração e resistência estomática, área foliar, Φ Open PSII, taxas de fotossíntese, fósforo inorgânico nas folhas e raízes, glicose,

frutose e sacarose nas folhas e raízes, amido nas folhas e raízes, invertase nas raízes, sacarose sintase nas folhas e raízes e sacarose fosfato sintase nas folhas, bem como o grau de ativação de sacarose fosfato sintase. Os resultados permitem concluir que a depressão de crescimento em porta-enxertos cítricos pode ser explicada pelas alterações nas taxas de fotossíntese e de utilização de fotoassimilados do hospedeiro. A presença de fungo micorrízico arbuscular aumenta a síntese de sacarose, por aumentar a atividade estado de ativação de SPS.

BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE GROWTH DEPRESSION OF INOCULATED CITRIC ROOTSTOCKS WITH ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI IN HIGH DOSES OF PHOSPHATE

Author: JOSÉ OZINALDO ALVES DE SENA

Adviser: Profa. Dra. ELKE J. B. N. CARDOSO

SUMMARY

Some plant species when mycorrhized, and cultivated in high levels of available phosphorus in the soil or substrate present growth depression. This phenomenon can be due to or be related to the alteration of the photosynthetic rates and the use of carbohydrates of the host plant. With the aim of testing this hypothesis, experiments were carried out on a greenhouse, cultivating citric root-stocks Limoeiro Cravo (*Citrus limonia* (L.) Osbeck) and Tangerineira Cleópatra (*Citrus reshni* Hort. ex Tanaka). The rootstocks were inoculated or not with Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) (*Glomus intraradices* Schenck & Smith) and cultivated with different levels of phosphorus (0, 200, 400, 600 e 800 mg kg⁻¹) (Experiment 1) or with (50, 200, 400 e 800 mg kg⁻¹) (Experiment 2). It was used as substrate a mixture of sandy soil + sand, in the proportion of 3:1, previously corrected with dolomitical lime and autoclaved. Additionally to the P doses the root-stocks were fertilized with N (80 mg kg⁻¹; NH₄NO₃) and micronutrients (-Mn). The experiment was installed in agreement with a completely randomized factorial design (5x3x3) and five replications were used (Experiment 1) and four replications (Experiment 2) per treatment. Six months after the transplant, the plants were picked, evaluated and analyzed. As answer variables were studied: plant height, dry or fresh mass from the shoot, root's fresh mass, shoot/root relationship, transpiration and stomatic resistance, foliar area, ΦOpen PSII, photosynthetic rates, inorganic phosphorus in leaves and roots, glucose, fructose and sucrose in leaves and roots, starch in leaves and roots, the activity of enzymes such as: invertase, sucrose sintase in leaves and roots and sucrose

phosphate sintase in leaves, as well as the degree of ativation of sucrose phospate sintase, were analysed. The results provid evidences that the growth depression in citric root-stocks can be explained by the alterations in the photosynthetic rates and by the use of host's photoassimilates. The presence of arbuscular mycorrhizal fungi increases the sucrose synthesis, by increasing the activity state of activation of SPS.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca na citricultura mundial como maior produtor de citros. Essa atividade tem proporcionado muitas divisas ao país e empregado muita mão de obra nos diferentes segmentos do setor produtivo, o que firma a sua importância econômica e socialmente. Entretanto, a média de produção de frutos da citricultura nacional encontra-se em níveis bem inferiores aos obtidos em outros países produtores, como os Estados Unidos. Esta realidade resulta de problemas fitossanitários, fitotécnicos e edáficos, que precisam ser superados.

Dentre as práticas já preconizadas pela pesquisa, a seleção de plantas com alto potencial produtivo e a adequada combinação entre copa e porta-enxerto, são determinantes. Nesse contexto, o uso de micorrizas, apesar da sua importância agronômica, proporcionando maior eficiência no uso de nutrientes, economia de fertilizantes, benefícios físicos e biológicos ao solo, maior proteção fitossanitárias às culturas, ainda é, uma prática relegada a segundo plano, permanecendo à margem dos interesses de órgãos governamentais de fomento, de pesquisa e de extensão, bem como dos setores de produção.

Com base em resultados de pesquisas no Brasil e exterior pode-se aquilatar os inúmeros benefícios proporcionados pela introdução do fungo micorrízico no sistema produtivo de culturas anuais e perenes. No caso dos citros a produção de porta-enxertos seria especialmente beneficiada, em termos de economia de água, proteção de plantas à pragas e doenças de difícil e oneroso controle, como os nematóides, eficiência no uso de nutrientes e racionalização no uso de adubos, na redução de efeitos tóxicos de metais comuns em solos ácidos (Al^{3+} e Mn^{2+}), na compensação da capacidade diferenciada dos porta-enxertos na absorção de nutrientes do solo. Em conjunto, esta técnica pode resultar

na redução dos custos de produção, em maior oferta de mudas sadias com alto potencial de produção. Some-se a isto, os benefícios ao meio ambiente, resultantes da economia de insumos (adubos e agrotóxicos) e de recursos naturais não renováveis.

A técnica de inoculação de fungos micorrízicos, em especial os arbusculares (FMA) em culturas de importância econômica, apresenta algumas limitações que têm sido objeto de pesquisa em muitos países, inclusive no Brasil. Uma delas é a dificuldade de cultivo do fungo em condições axênicas, *in vitro* e produção de inóculo, limitando o seu estudo separado da planta hospedeira. Outra, é a compatibilização entre o uso de FMA e o uso de insumos, especialmente adubos, usados em larga escala na produção de mudas e condução das plantas cítricas a campo.

Além disso, os estudos de melhoramento de plantas como, fertilidade de solo e nutrição de plantas são baseados em plantas não micorrizadas e toda a recomendação de adubos é pautada nesse sistema, o que desfavorece a popularização dessa prática. Um exemplo disso é a existência de redução de crescimento e produção de biomassa de plantas cítricas micorrizadas, cultivadas em doses altas de P. Essa “depressão de crescimento” em plantas micorrizadas, é explicada por algumas hipóteses: a produção de toxinas pelos MAs, alteração da cinética de absorção de P, alteração da relação entre a biomassa fúngica intra- e extrarradicular.

Outra hipótese para explicar depressão de crescimento diz respeito à alterações da taxa de fotossíntese. É esperado que, qualquer alteração no balanço do conteúdo de P resulte numa alteração na fotossíntese e na síntese de carboidratos, pois existe uma relação direta entre a fixação de carbono nos cloroplastos e a síntese de sacarose no citosol, mediada pela troca estequiométrica de P inorgânico e triose fosfato. Assim, é possível que plantas cítricas micorrizadas com FMA e cultivadas em condições ótimas ou supra ótimas de P, a concentração desse elemento no citosol das células hospedeiras seja limitante para atender o aumento da demanda por fotossintatos pelo fungo, resultando no desenvolvimento de sintomas de depressão de crescimento.

Diante do exposto, a presente tese, tem por objetivo testar a hipótese relacionada a alteração da taxa fotossintética e de utilização de fotossintatos em porta-enxertos cítricos micorrizados e cultivados com diferentes doses de fosfato, visando

esclarecer a fisiologia da depressão de crescimento em plantas micorrizadas com Fungo Micorrízico Arbuscular (FMA), o que será decisivo para gerar subsídios úteis à produção de mudas e manejo dos citros.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O termo micorriza se refere a associação entre fungos e raízes, ou qualquer outro órgão de plantas superiores envolvido na absorção de nutrientes pelo hospedeiro. Esta associação é considerada uma simbiose mutualística, devido à alta interdependência e benefícios comuns estabelecidos entre os parceiros, no qual a planta hospedeira recebe nutrientes minerais via micélio do fungo (micotrofismo) e o fungo heterotrófico (quimiorganotrófico) obtém fotoassimilados da planta hospedeira (Harley & Smith, 1983; Harley, 1989; Azcón-Aguilar & Bago, 1994).

2.1 Colonização radicular e fosfato

Observa-se, mesmo em espécie com dependência micorrízica, que dependendo do nível de disponibilidade de nutrientes no solo, a colonização intra e extrarradicular pode ser bastante reduzida. Fatores genéticos, edáficos e de manejo de solo e cultura (Lopes et al., 1983) podem estar associados a esta resposta.

Os efeitos de fósforo em altas doses na redução da colonização, produção de esporos e micélio externo de fungo micorrízico arbuscular, são muito conhecidos (Mosse, 1973; Menge et al., 1978; Koide, 1990; Barea, 1991). Hipóteses para explicar este efeito estão associadas aos ânions fosfato, afetando a fase externa do fungo e a influência negativa de altos níveis de P sobre a colonização das células corticais. Observações, feitas mediante aplicações de P via foliar, reforçam esta hipótese (Sanders, 1975). Aumentos nas concentrações de P nas raízes (Graham et al., 1981; Howeler, 1981) podem reduzir a colonização. Os mecanismos para explicar essas respostas são

controversos, envolvem enzimas (Woolhouse, 1975) e alterações na permeabilidade da membrana das células corticais (Ratnayake et al., 1978).

Outro mecanismo é o controle do nível de colonização pela planta através do metabolismo e transporte de carboidratos, que também são influenciados pelo suprimento de P. O alto suprimento de P resultaria em aumento de síntese de sacarose, que envolve a troca estequiométrica de triose fosfato, no cloroplasto, por fósforo inorgânico do citosol. A sacarose sintetizada seria conduzida por transportadores específicos via floema (Herold & Walker, 1979), aumentando as concentrações do açúcar e seus derivados nas células corticais (Ratnayake et al., 1978; Graham et al., 1981), o que poderia ser desfavorável ao crescimento do fungo. Os açúcares tanto em alta concentração, podem inibir a germinação e crescimento do tubo germinativo dos fungos formadores de micorriza arbuscular (Mosse, 1959; Koske, 1981; Siqueira et al., 1982), como favorecer, em baixa concentração, índices de colonização (Azcon & Ocampo, 1981). Mesmo ocorrendo inibição da colonização micorrízica, com o aumento da dose de P, a concentração de carboidratos nas raízes pode ser máxima (Amijee et al., 1993), contrário a hipótese de que maiores concentrações de carboidratos solúveis nas raízes favorecem o estabelecimento da colonização.

Em função da estreita relação entre a disponibilidade de P no solo ou no substrato e conteúdo de carboidratos, foram estabelecidos limites de resposta à inoculação com FMA: abaixo de 3 ppm de P disponível, passaria a existir patogenicidade (Menge et al., 1982) ou simbiose parasítica (Siqueira & Colozzi-Filho, 1986), o mesmo aconteceria acima de 300 ppm (Siqueira & Colozzi-Filho, 1986).

Quando a disponibilidade de P é muito baixa, a simbiose micorrízica pode ser reduzida (Koide & Li, 1990; Abbott et al., 1984), indicando que a regulação da infecção micorrízica parece ser controlada por alterações fisiológicas na planta hospedeira, e, mais especificamente, por fatores relacionados à raiz (Koide & Li, 1990). A síntese e a degradação de grânulos de polifosfatos nos vacúolos podem constituir-se num auto mecanismo de regulação, através do armazenamento do excesso de P ou sua transferência para o hospedeiro quando necessário (Smith & Gianinazzi-Pearson, 1988).

Outra hipótese usada para explicar a regulação do crescimento e

desenvolvimento de micorrizas arbusculares, é a atuação de enzimas, como endoquitinases e β -1,3-endoglucanases, ligadas às respostas de defesa da planta. Endoquitinases podem controlar a colonização intrarradical do fungo, ao romper estruturas da parede celular na extremidade das hifas em crescimento e/ou por degradar estruturas residuais do fungo, inibindo o seu crescimento. Em baixo nível de P, haveria indução local de glucanase, com parcial degradação da parede celular da planta hospedeira, resultando em crescimento intracelular do fungo; em alto nível de P, haveria degradação de estruturas do fungo que inibiria o seu crescimento e desenvolvimento interno (Lambais & Medhy, 1995).

2.2 Depressão de crescimento: definição e ocorrência

A resposta de crescimento e desenvolvimento de plantas quando inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares podem variar em função de fatores relacionados às condições edafoclimáticas, ao microssimbionte (fungo micorrízico), ao macrossimbionte (planta) e às interrelações estabelecidas na simbiose. Dentre esses fatores, o fósforo disponível no solo ou substrato tem merecido destaque especial por parte da pesquisa, principalmente no que se refere à sua relação com os mecanismos que regulam a infecção, colonização, crescimento e desenvolvimento da micorriza, absorção de nutrientes, crescimento e desenvolvimento da planta hospedeira.

Algumas espécies vegetais apresentam depressão no crescimento, quando micorrizadas e sob níveis altos de P disponível, (Cooper, 1975; Hall et al., 1977; Buwalda & Goh, 1982; Kiernan et al., 1983; Koide, 1985; Baas & Lambers, 1988; Son & Smith, 1988; Smith & Gianinazzi-Pearson, 1990; Antunes & Cardoso, 1991; Peng et al., 1993), inclusive quando cultivadas a campo. Essa depressão pode ser de natureza transitória ou persistente (Azcón-Aguilar & Bago, 1994; Jakobsen, 1995). A de natureza transitória pode ser tolerada pela planta, se o balanço líquido da simbiose for positivo para o desenvolvimento da planta a longo prazo (Jakobsen, 1995), o que depende do nível de P, e da espécie de fungo, sendo mais evidente em níveis mais altos de P e em

condições de intensa colonização radicular. Podem ser explicadas pela existência de dreno de carbono estabelecido pelo fungo.

Neste contexto, a competição por P entre fungo e planta hospedeira pode também resultar em depressão de crescimento. Mas, observa-se a existência de depressão transitória em muitas plantas cultivadas associada a doses altas de P (Cooper, 1975) e sob a reduzida intensidade luminosa (Son & Smith, 1988).

Por outro lado, a depressão de crescimento persistente tem sido observada em períodos mais longos, superiores a dois meses, e em condições de doses altas de P. Esse tipo de resposta é explicado por algumas hipóteses:

a. Competição por fósforo entre a planta e o fungo (Crush, 1973), o que tem sido contestado por ocorrer depressão de crescimento mesmo em concentrações não limitantes de P, onde a competição pela obtenção do nutriente é pouco provável;

b. Competição por fotossintatos: embora decréscimos na concentração de carboidratos na parte aérea de plantas micorrizadas tenham ocorrido (Buwalda & Goh, 1982), depressões de crescimento têm sido observadas com baixo nível de colonização micorrízica (Hall et al., 1977);

c. Perda de peso da planta bem nutrida em P (Harley, 1969; Stribley et al., 1980): neste caso, a resposta em crescimento pelas plantas micorrízicas é determinada por processos opostos, um benéfico, devido ao aumento na absorção de P do solo causado pelo fungo, e outro detrimental, provocado pela utilização de produtos da fotossíntese pelo fungo. Apesar de apenas 10 % da matéria seca das MA ser biomassa fúngica (Tinker, 1978), o simbiote funcionaria como um competidor por produtos elaborados pela planta, pois ela aumenta a respiração das raízes em até 74 % (Pang & Paul, 1980) e causa acúmulo de carbono no citoplasma das células corticais (Cox & Tinker, 1976). Para compensar estas perdas, as plantas colonizadas exibem maiores taxas fotossintéticas (Allen et al., 1981). O balanço dos dois processos normalmente resulta em aumento no crescimento das plantas colonizadas, mas pode também resultar em redução no caso de plantas crescendo em altos níveis de P disponível. Nessa hipótese os cálculos das perdas de massa seca, bem como a análise do sistema são baseados na comparação entre as relações (%P/massa seca da parte aérea)_{colonizado} *versus* (%P/massa

seca da parte aérea) não colonizado.

d. Existência de patogenicidade: o fato da defesa vegetal ser ativada durante o início do desenvolvimento das micorrizas arbusculares e suprimido nas fases subsequentes (Spanu et al., 1989; Lambais & Mehdy, 1993), sugere certa patogenicidade transitória, que é utilizada para explicar a depressão do crescimento vegetal em condições de altos níveis de P (Kiernan et al., 1983). A natureza patogênica dos fungos MA pode ser uma função da concentração de P no solo, de forma que em condições de altos níveis de P, a transição da fase patogênica para a fase mutualística não ocorre. A supressão do sistema de defesa vegetal pode ser um dos fatores que contribuem para a transição da fase patogênica para a fase mutualística, e essa supressão decresce com o aumento do nível de P no solo (Lambais & Mehdy, 1993).

e. Toxidez por P (Mosse, 1973b; Antunes & Cardoso, 1991): resultante da absorção excessiva do elemento pelas raízes micorrizadas. No entanto, as concentrações de P apresentadas nessas condições têm sido mais baixas do que aquelas normalmente associadas com toxidez de P e sintomas de toxidez não têm sido observados;

f. Efeito hormonal: de acordo com Gerdemann (1968) não há evidência clara da produção hormonal em resposta à inoculação de FMA e a não alteração de características morfológicas após a infecção reforçaria esse pressuposto. Fungos micorrízicos podem influenciar o crescimento da planta hospedeira pela produção de compostos hormonais. Aumentos das atividades de citocininas em folhas (57 %) e raízes (111 %) (Allen et al., 1980), de ácido abscísico (ABA) (Danneberg et al., 1992), foram observados. Aumentos em ABA foram correlacionados ao aumento do nível de fósforo no meio, enquanto o aumento dos níveis de citocinina estão envolvidos no aumento de fotossíntese e crescimento de *Linum usitatissimum*, L. micorrizado (Drüge & Schönbeck, 1992). Tem sido observada a produção de compostos com atividade auxínica por fungo micorrízico, sendo sugerido a sua transferência do fungo para a planta hospedeira durante o estabelecimento da micorriza (Barroso et al., 1986);

g. Produção de toxinas: em altos níveis de P, fungos MA produziriam toxinas como os fungos patogênicos. Ou, em alto nível de P, plantas micorrízicas deixariam de produzir compostos essenciais para o estabelecimento do mutualismo, só produzido em

condições de baixo nível de P.

h. Alteração da cinética de absorção de P: essa alteração limitaria a disponibilidade de P para o metabolismo normal das plantas, resultando em depressão de crescimento;

i. Alteração da relação entre a biomassa fúngica intra- e extrarradicular: em condições de alto P, o crescimento e metabolismo das hifas externas seriam alterados de modo que, em condições extremas, causaria depressão de crescimento. A depressão, poderia ser explicada por um desbalanço na relação entre a biomassa fúngica intrarradicular e a biomassa fúngica extrarradicular. Uma demanda extra de energia seria responsável pelos sintomas de depressão;

j. Alteração da taxa fotossintética e de utilização de carboidratos: alterações no balanço do conteúdo de P resultaria numa alteração dos mecanismos regulatórios do fotossíntese. Em função do efeito competitivo por P, causado por fungos MA, ao nível metabólico, a concentração desse íon no citosol das células hospedeiras seria limitante para atender ao aumento na demanda por fotoassimilados por parte desses fungos, resultando nos sintomas de depressão do crescimento;

k. Dreno de carboidratos: o requerimento de carboidratos da planta hospedeira por fungos micorrízicos pode causar depressão no crescimento de plantas (Cox et al., 1977). Hepper (1977) estimou que a biomassa de fungos micorrízicos pode chegar a 17 % do peso seco das raízes. A abundância de lipídio nos arbúsculos, vesículas e hifas, bem como a alta concentração de fosfolípidios e triglicerídios em raízes micorrizadas, comparado àquelas não micorrizadas, justificam essa demanda de energia (Cox et al., 1975; Nagy et al., 1980). Também tem-se observado altas taxas de respiração em sistemas micorrizados (Pang & Paul, 1980; Snellgrove et al., 1982; Harris et al., 1985; Peng et al., 1993) e o total de carbono requerido, usando ^{14}C apresentam valores entre 4 a 17 %, em relação ao total de carbono fixado (Pang & Paul, 1980; Kucey and Paul, 1982; Snellgrove et al., 1982; Koch & Johnson, 1984; Harris et al., 1985; Peng et al., 1993).

A demanda de carboidratos por citros micorrizados varia em função da dependência micorrízica (Graham et al., 1991; Graham & Eissenstat, 1994). O custo de

colonização micorrízica em espécies de citros altamente dependentes, como limão Volkameriano, em alto nível de P, inclui uma demanda de carbono 50% maior para as raízes, comparado às plantas não micorrizadas, sendo que 11% é destinado para as estruturas do fungo e 39% para atender o custo respiratório (Peng et al., 1993). Estes cálculos são baseados na teoria da economia de carbono (Bloom et al., 1985).

Em condições de alto suprimento de P, observou-se que a colonização micorrízica por *G. intraradices* provocou depressão de crescimento, em genótipos de citros com diferentes graus de dependência micorrízica (Graham & Eissenstat, 1994). No entanto, essa depressão verificada, não se correlacionou com a dependência micorrízica ou com o conteúdo de ácido graxo presentes nas estruturas do fungo, que é um índice potencial do custo de construção de fungos micorrízicos em raízes de citros. (Peng et al., 1993; Graham & Eissenstat, 1994; Graham et al., 1994; Graham et al., 1997). Não observou-se também correlação com a alocação de C para as construções de estruturas do fungo (Graham et al., 1991).

A exportação de carbono para atender a demanda de fungo micorrízico, em citros, é regulada pela concentração de C disponível na forma de carboidrato estrutural presente nas raízes e outros tecidos (Graham et al., 1991; Graham & Eissenstat, 1994). O papel da disponibilidade de carboidratos no apoplasto de raízes e sua exsudação a partir das raízes na regulação da dinâmica da colonização radicular tem sido reconhecida (Graham et al., 1981; Schwab et al., 1991; Amijee et al., 1993), mas há pouca informação sobre a caracterização quantitativa e qualitativa desses carboidratos.

Os FMA ocupam uma pequena fração do volume nos tecidos de raízes micorrizadas e os cultivos axênicos, limitados pelas dificuldades de se cultivar o fungo *in vitro*, reduzem a disponibilidade de quantidades suficientes de material para a realização de estudos metabólicos mais detalhados (Harley & Smith, 1983; Shachar-Hill et al., 1995). Assim, pouco sabe-se em detalhes sobre as rotas metabólicas em que o carbono fixado pelo hospedeiro é utilizado pelos fungos. Menos se conhece dos efeitos do hospedeiro sobre o metabolismo do fungo micorrízico. Entretanto, muitas informações têm sido obtidas sobre metabolismo usando-se cultivos axênicos de fungos ectomicorrízicos (Martin et al., 1984; Martin et al., 1988; Ramstedt et al., 1987). Nesses

fungos, manitol é altamente marcada, quando glicose marcada é fornecida (Chen & Hampp, 1993)). Por outro lado, o principal carboidrato armazenado em esporos de FMA é a trealose (Bécard et al., 1991; Schubert et al., 1992). No entanto, não se sabe ainda em que extensão o metabolismo de carboidratos em espécies ectomicorrízicas é similar ao que ocorre em espécies endomicorrízicas (Sachar-Hill et al., 1995).

Aumentos na absorção de P estão diretamente relacionados com a produção de fotoassimilados para atender a demanda de fungos micorrízicos. Sob condições limitantes de P, o crescimento de plantas é estimulado porque há disponibilidade abundante de carbono. No entanto, se o P não é limitante e a utilização de fotoassimilado pela micorriza não é reduzida, as plantas micorrizadas podem tornar-se limitadas em carbono, o que levaria a reduções no crescimento ou de produção de biomassa vegetal, comparado ao sistema não micorrizado.

Para que haja otimização do funcionamento do sistema, com crescimento e desenvolvimento vegetal, deve existir uma relação C/P adequada entre o P absorvido e C fixado pela micorriza. Para soja, durante o crescimento micotrófico, foi constatada uma relação de 140:1 (g átomo/g átomo) (Harris et al., 1985). Essa relação pode variar em função do nível de P da planta hospedeira (Harris & Paul, 1987). Dentro de certos limites, aumentos da intensidade luminosa e CO₂, poderiam estender a faixa de concentração de P no tecido da planta hospedeira e permitir crescimento micotrófico (Harris & Paul, 1987).

Os aumentos das taxas de fotossíntese em planta micorrizadas são primariamente devido às adaptações morfológicas, que resultam em aumento de área foliar (Snellgrove et al., 1982). Plantas crescidas em condições que limitem aumentos de área foliar terão maior probabilidade de apresentar depressão de crescimento, pois não haveria expansão desse importante fator.

2.3 Metabolismo de carboidratos e atividade enzimática

O fluxo de carbono entre a planta hospedeira e FMA está relativamente bem entendido em termos quantitativos, mas o mesmo não ocorre quando se trata dos mecanismos e identificação de compostos envolvidos na transferência de carbono (Jakobsen, 1995). Alterações na relação fonte-dreno influenciam as taxas de translocação de sacarose das regiões de fonte para regiões de dreno. Essas taxas de translocação têm sido correlacionadas com as atividades nas regiões de dreno, níveis de sacarose nas folhas e atividade de sacarose fosfato sintase, enzima chave na síntese de sacarose (Harris & Paul, 1987). Em plantas micorrizadas, o dreno de fotoassimilados da planta hospedeira é devido ao estabelecimento de gradiente de carboidrato, resultante da conversão dos carboidratos transportados em compostos específicos de fungo (manitol, trealose e glicogênio), da síntese de aminoácidos via reações anapleróticas ou do consumo destinado ao metabolismo respiratório do fungo (Schubert et al., 1992; Hoffmann et al., 1997). Essa maior demanda por carbono, significa para a planta cítrica com raízes colonizadas por FMA, um requerimento de carbono 50 % maior, quando comparadas com plantas não micorrizadas. (Peng et al., 1993; Graham et al., 1997). Esse dado foi gerado sob alto suprimento de P. Em baixo nível de P, a quantidade de carbono requerida pelo fungo é da ordem de 4 a 17 % do carbono fixado (Pang & Paul, 1980; Kucey & Paul, 1982; Snellgrove et al., 1982; Harris et al., 1985).

Apesar da massa fúngica ativa representar uma pequena fração da massa seca da planta hospedeira, é responsável por aumentos significativos nos custos de carbono em subsuperfície, quando comparado com o sistema não micorrizado. (Rygielwicz & Andersen, 1994; Peng et al., 1993). Assim, em função da existência de dreno, funcionando como “válvula bioquímica” para movimentar sacarose (Harley & Smith, 1983), espera-se que o metabolismo de carboidratos do hospedeiro e fungo seja alterado no estado simbiótico. A definição do “status” metabólico do hospedeiro como regulador do metabolismo de carboidratos do fungo é recente (Shachar-Hill et al., 1995), ocupando a glicose papel central na relação hospedeiro-fungo.

A concentração de carboidratos na planta hospedeira e fungo, pode variar no

estado simbiótico. Na planta hospedeira essas alterações são menos evidentes na parte aérea (folhas) e mais marcantes e controversas nas raízes. A intensidade de resposta pode variar em função do nível de fósforo no solo ou substrato, da concentração de P na planta, taxa e extensão da colonização interna e externa, do nível de dependência micorrízica de espécies e cultivares e do tipo de açúcar a ser analisado, dentre outros.

No geral, as concentrações de carboidratos nas raízes micorrizadas, comparadas com o controle, não micorrizado, e em baixo nível de P, apresentam as seguintes tendências:

- a.** Concentrações de açúcares solúveis não diferem (Mosse, 1973a; Hayman, 1974));
- b.** Concentrações de açúcares solúveis, glicose, frutose e amido maiores (Cox et al., 1975; Dixon & Cox, 1978; Jakobsen, 1995);
- c.** Concentrações de açúcares solúveis maiores e amido menores (Dixon & Cox, 1988).

Quando o nível de P do solo ou substrato é alto, as seguintes respostas podem ser encontradas:

- a.** Menores concentrações de açúcares solúveis (Thomson et al., 1990; Jakobsen, 1995);
- b.** Maiores concentrações de açúcares solúveis (Amijee et al., 1990; 3. Menores concentrações de amido e sacarose (Graham et al., 1997).

Há também em raízes micorrizadas um efeito temporário na redução de carboidratos solúveis, correspondente ao período inicial de colonização intensa, em baixo nível de P (Jakobsen, 1995), mas que tende a crescer, no tempo, com o aumento da intensidade de colonização. Por outro lado, as folhas de plantas colonizadas com FMA, em baixo nível de P, apresentam maiores concentrações de açúcares solúveis, sacarose, açúcares redutores (glicose e frutose), amido, total de carboidratos não estruturais (Bevege et al., 1975; Neme & Guy, 1982; Snellgrove et al., 1982; Dixon & Cox, 1988; Jakobsen, 1995), e em condições de alto nível de P, as concentrações de amido tendem a ser menores (Graham et al., 1997), em relação as plantas não inoculadas.

Como visto anteriormente, na associação mutualística entre FMA e planta hospedeira, há comprovada demanda de carbono para atender as exigências em energia da raiz e do fungo em crescimento. Assim a sacarose deve ser transportada, via floema, para a região de dreno, onde serão hidrolisadas as hexoses que ficarão a disposição da simbiose. O fósforo é um importante fator que pode influenciar a alocação e partição de carbono no hospedeiro, pois está diretamente relacionado com os mecanismos de regulação da colonização intra e extrarradicular, com a disponibilidade de carboidratos no sistema micorrízico e com a síntese de sacarose e amido. Deficiências de P causam decréscimo no conteúdo de carboidratos solúveis em folhas, com aumento de amido. Isto decorre da ligação existente entre fosfato e a síntese de sacarose e amido (Cseke et al., 1984; Walker & Sivak, 1986) e pode, então, influenciar a alocação de fotossintatos entre sacarose no citosol e amido no cloroplasto (Worrell et al., 1991; Bruneau et al., 1991).

Assim, um limitado suprimento de P causará retenção de triose fosfato no estroma do cloroplasto, favorecendo a síntese de amido sobre a de sacarose, tornando evidente que, o controle da síntese de sacarose constitui um importante fator na regulação da exportação de sacarose, fotossíntese e formação de amido.

Esse controle pode ser regulado por dois mecanismos:

- a. O controle no citosol de Frutose 1,6-bisfosfatase (Fru1,6Pase) pelo metabólito regulatório Frutose-2,6-bisfosfato (Fru2,6P₂) e
- b. Controle da atividade de SPS por efetores alostéricos e fosforilação de proteína (Huber & Huber, 1992; Huber & Huber, 1996).

Como pode ser visto na Figura 1, Fru1,6Pase, no citosol, catalisa a primeira reação irreversível que leva à síntese de sacarose e é, portanto, colocado estrategicamente para regular a remoção de triose fosfato do ciclo do carbono, ou do ciclo de Calvin-Benson, no cloroplasto (Stitt et al., 1983; Stitt et al., 1988; Stitt, 1990; Hampp et al., 1995). Aumentos nas concentrações de Fru2,6P₂ levam a inibição da enzima Fru1,6Pase, favorecendo a via glicolítica, assim reduzindo a produção de sacarose. Fru2,6P₂ é sintetizado pela enzima Fru6P,2-kinase e degradado por F2,6Pase. A síntese desse metabólito é favorecida por fósforo inorgânico (Pi) e Frutose-6-P (Fru-6-

P), que atuam ativando a enzima sintetizadora Fru6P,2-kinase e inibindo a ação hidrolítica exercida por F2,6Pase (Hers & VanSchaftingen, 1982; Cseke et al., 1984; Stitt, 1990).

Gly3P (gliceraldeído-3-fosfato), Glc6P (glicose-6-P), TP (trioses fosfato), F16bisP (frutose 1,6 bisfosfato), FBPase (frutose bisfosfatase), GPI (glicose fosfoisomerase), GPM (glicose fosfomutase), PFK2 (fosfofrutokinase 2), UDPGlc (UDPGlicose), SacP (sacarose fosfato), SPS (sacarose fosfato sintase), SuSy (sacarose sintase).

Figura 1. Regulação da síntese de sacarose e amido em folhas (Einig¹).

Assim, aumentos nas concentrações de Pi e Fru-6-P no citosol ativarão Fru6P,2-kinase, favorecendo a síntese de Fru2,6P₂, que inibirá Fru1,6Pase, concorrendo para reduzir a síntese sacarose (Stitt, 1990; Hampp et al., 1995). Quanto ao controle da síntese de sacarose por SPS (Sacarose Fosfato Sintase), pode ocorrer pela ação de efetores alostéricos e fosforilação de proteínas. Os efetores alostéricos Glicose-6-P (Glc-6-P), um intermediário da síntese de sacarose e inibidor de SPS kinase (Weiner et al. 1992), ativa, enquanto Pi inibe atividade de SPS na maioria dos tecidos (Doehlert & Huber, 1983; Huber & Huber, 1996; Loewe et al., 1996). O segundo controle de SPS (Figura 2) é feito por modificação covalente, devido a fosforilação/desfosforilação de proteínas (Walker & Huber, 1989; Huber & Huber, 1991; Reimholz et al., 1994).

Desta forma, a SPS pode ser inativada por fosforilação, por uma SPS kinase

¹ EINIG, W. Comunicação pessoal, 1998.

Salvucci, 1991; Echeverria, 1992; Echeverria et al., 1997).

A sacarose sintetizada no citosol de folhas maduras, consideradas como região de “fonte”, está disponível para ser transportada para regiões de “dreno”. Esse transporte se dá via floema, através de transportadores de sacarose, pela via simplástica (plasmodesmas) ou apoplástica. Se a rota de carga (loading) de sacarose no floema do mesófilo para células vasculares, ocorre pela via simplástica ou apoplástica em tecidos “fonte” (folhas maduras), é assunto polêmico (Turgeon & Beebe, 1991; Sonnewald & Willmitzer, 1992; Evert & Russin, 1993; Roitsch & Tanner, 1996). Também, há alguma controvérsia quanto a via de “descarga” (unloading) de sacarose para regiões de dreno (Giaquinta, 1978; Möller & Becker, 1992; Sonnewald & Willmitzer, 1992; Evert & Russin, 1993). Mais recentemente tem sido proposto que em folhas a descarga de sacarose no floema deve ser preferencialmente apoplástica (Evert & Russin, 1993; Roitsch & Tanner, 1996). É possível que ambos os mecanismos, apoplástico e simplástico, operem simultaneamente (Dickinson et al., 1991). Uma vez no citosol, a sacarose seria hidrolisada pela ação de invertase alcalina (ou neutra), de invertase ácida no vacúolo e de sacarose sintase, como proposto na Figura 3 (Egger, 1993; Roitsch & Tanner, 1996).

Figura 3. Síntese e hidrólise de sacarose em folha (Egger, 1993).

Considerando-se como verdadeira a existência tanto de descarga da sacarose, pela via apoplástica em regiões de dreno, como da ação de uma invertase ácida ligada à parede celular, a hidrólise da sacarose por essa enzima seria o pré-requisito para o uso exógeno de sacarose como fonte de carbono para muitos fungos. Invertases (β -frutofuranosidases, EC 3.2.1.26), responsáveis pela hidrólise de sacarose em glicose e frutose, é um grupo de enzimas de plantas consideradas onipresentes, com diferentes pH ótimos e localização subcelular. Podem ser ácidas, neutras ou alcalinas. O pH das invertases ácidas pode variar de 4,5 a 5,5, enquanto a faixa de pH das invertases neutra e alcalina podem variar de 6,8 a 8,0 (Lee & Sturm, 1996). As invertases ácidas são glicoproteínas ligadas ao nitrogênio e podem ser encontradas como proteínas solúveis no vacúolo ou ionicamente ligadas à parede celular (Koch et al., 1996). Por outro lado, as invertases neutra e alcalina são consideradas como polipeptídios citoplasmáticos não glicosilados.

A atividade de invertases ácidas é encontrada principalmente em órgãos vegetais imaturos e em crescimento ativo e decresce rápida e paralelamente com o acúmulo de sacarose quando estes órgãos caminham para a maturidade. Além disso, tem sido verificada uma direta correlação entre o nível de hexose e a atividade dessa enzima (Richardson et al., 1990; Ranwala et al., 1992; Takahata et al., 1996). Um modelo de regulação de invertase ligada à parede celular por hexose foi proposto por Roitsch & Tanner (1996). Neste modelo, a sacarose transportada do floema por transportadores específicos, é disponibilizada no apoplasto onde é hidrolizada por uma invertase extracelular com um pH ácido ótimo (Echeverria et al., 1992; Van den Ende & Van Laere, 1993; Pradel et al., 1996) (Figura 4).

Transportadores de hexoses serão responsáveis pela absorção dos monossacarídeos, os quais concorrem para aumentar a síntese e secreção de invertase ligada à parede celular. Assim, sugere-se que, invertases ácidas estão envolvidas no metabolismo de sacarose, “descarga” de fotoassimilados no floema, controle da composição de açúcares em órgãos de reserva, osmorregulação, gravitropismo, respostas a patógenos e alojamento e com o crescimento vegetal, por influenciar os mecanismos de alongação celular (Morris & Arthur, 1995). Por outro lado, as invertases, neutra e

alcalina, parecem estar confinadas a tecidos maduros e, resultados de pesquisas com essas enzimas sugerem que elas participam da hidrólise de sacarose no citoplasma de células com deficiência de invertase ácida.

Figura 4. Regulação de invertases por hexoses (Roitsch & Tanner, 1996).

Um aspecto importante das invertases é a ocorrência de isoformas com diferentes localizações subcelulares e propriedades bioquímicas únicas e que permite assim um controle independente do metabolismo, translocação e reserva da sacarose. Em folha de videira, por exemplo, foi encontrada atividade de uma invertase insolúvel na faixa de pH entre 2,5 a 5,5, que, de acordo com os autores e pelas características apresentadas, pode ser uma isoenzima (Ruffner et al., 1990). Apesar desse resultado ter sido interpretado como simples meio de extração e precipitação de proteínas induzidas por polifenóis ou hidrólise química da sacarose, que podem ocorrer espontaneamente com $\text{pH} < 4,0$ (Echeverria, 1990). Ruffner et al. (1990) não respaldam essa hipótese.

As pesquisas envolvendo enzimas sacarolíticas, como as invertases, apesar de importantes, são escassas em plantas micorrizadas. Sabe-se que o estabelecimento de micorrizas pode criar um significativo aumento na força de dreno nas raízes. Estima-se

que a retenção de carbono e respiração pelas hifas envolve de 4 a 20 %, em micorriza arbuscular e acima de 30 %, em ectomicorrizas, da respiração total em subsuperfície (Peng et al., 1993). Essa atividade de dreno em micorriza tem sido relacionada com a oferta de sacarose pelo hospedeiro e com a transformação desse açúcar em compostos específicos do fungo (Hampp et al., 1994). Uma vez que fungos ectomicorrízicos geralmente apresentam deficiência de atividade da invertase, há a necessidade de invertase apoplástica ligada à parede das células do hospedeiro para tornar a sacarose e seus produtos disponíveis para o fungo (Schaeffer et al., 1995; Salzer & Hager, 1993; Hampp et al., 1994). É possível que algo semelhante ocorra em micorrizas arbusculares. Em ectomicorriza, Schaeffer et al. (1995) não verificaram diferenças na atividade de invertase ácida entre raízes de plantas micorrizadas e não micorrizadas com *Amanita muscaria*. Resultado considerado contraditório, pois era de se esperar uma alta atividade de invertase em raízes micorrizadas (Figura 4).

Outra enzima sacarolítica de grande importância para suprir os fungos micorrízicos de carboidratos é a sacarose sintase. Tem-se observado que a atividade desta enzima é um bom indicador da habilidade dos órgãos vegetais de funcionarem como drenos de assimilados (Claussen et al., 1986). Órgãos que acumulam muitos assimilados, tendem a apresentar altas atividades de sacarose sintase. Sua principal importância fisiológica parece estar associada com a habilidade de hidrolizar sacarose, produzir UDPglicose e seus derivados que são substratos para a síntese de parede celular e compostos de reserva (Robinson, 1996). Em função dessas características, sacarose sintase é considerada enzima chave, de alta atividade no metabolismo de órgãos “drenos” (folhas e caules em crescimento, frutos e raízes). Também sacarose sintase está intimamente ligada à conversão de sacarose em amido (Claussen et al., 1986).

Poucos são os estudos envolvendo sacarose sintase em sistemas micorrízicos. Em ectomicorrizas, adicionalmente à ação de invertase ácida, sacarose sintase converte sacarose em UDPglicose e frutose, que constituirão substrato para a síntese de parede celular, glicólise ou formação de amido (Hampp et al., 1995).

Na Figura 5, é apresentado um modelo de metabolismo de sacarose em raízes de *Picea abies* colonizadas com *Amanita muscaria* (ectomicorriza). Nesse esquema é

incluído o ciclo do manitol, que opera apenas em ascomicetos (A) e a formação de trealose, dominante em basidiomicetos (B). Pelo modelo, nas células do fungo, F26BP ativa PFK (fosfofrutokinase), e nas células do hospedeiro ativa PFP (frutose-6-fosfato fosfotransferase dependente de PPi).

AA (amino ácidos), ADPG-PP_iase (ADP-glicose pirofosforilase), HK (hexokinase), HP (hexoses fosfato), mtl 1P (manitol 1-fosfato) SS (sacarose sintase), TCA (ciclo de Krebs), TP = trioses fosfato.

Figura 5. Modelo de metabolismo da sacarose em raízes (Hampp et al., 1995).

2.4 Fluorescência da clorofila e taxas de fotossíntese

As plantas transformam energia solar através da fotossíntese, sendo sua eficiência fator determinante na produtividade agrícola. Essa eficiência pode ser determinada em termos da conversão da energia solar ou em fitomassa total ou em produtos úteis. A eficiência fotossintética de conversão da radiação fotossinteticamente ativa (400 a 700 nm) das culturas é baixa, não atingindo 1 % para a maioria das espécies. Em condições ótimas registram-se eficiências de 3-4 % para plantas do tipo C₃ e de 5-

6% para plantas do tipo C₄. No entanto, estima-se que a produtividade potencial vai a 12% (Machado, 1985).

Uma vez adotado um alto nível tecnológico no manejo agrícola, as principais culturas apresentam uma tendência à estabilização da produtividade. Investigações fisiológicas e genéticas da produtividade das plantas mostram que a produtividade potencial ainda não foi atingida inteiramente. Quando a eficiência da produtividade é baixa, o primeiro fator a ser citado como limitante é a fotossíntese. (Bernardes, 1987).

Ainda que ganhos de produtividade das culturas tenham sido conseguidos pelo aumento da área foliar, por mudanças na relação de biomassa vegetativa e reprodutiva, além de outras propriedades morfológicas, é bastante evidente que as pesquisas de melhoramento de plantas não foram dirigidas para o aperfeiçoamento do aparato fotossintético (Nasyrov, 1978). No entanto, nos últimos anos a pesquisa tem sido intensificada nessa área, principalmente usando recursos de bioquímica e biologia molecular e avanços têm sido obtidos, como a obtenção de plantas transgênicas mais eficientes fotossinteticamente.

Apesar da sua complexidade, a fotossíntese começa de uma forma bastante singular e aparentemente simples, envolvendo luz solar e CO₂ da atmosfera, água e nutrientes do solo. Inicialmente a molécula de água é quebrada, nos cloroplastos iluminados, para formar um receptor redutor de elétrons (reação de Hill). Por meio dessa reação a água é usada como fonte de elétrons para a fixação do CO₂. O oxigênio é eliminado durante o processo de fotossíntese. Os elétrons disponíveis são transferidos das membranas dos tilacóides através de uma cadeia transportadora de elétrons (esquema Z), para formar NADPH₂ e ATP. O poder redutor do NADPH₂ e a energia da hidrólise do ATP são utilizados nas reações enzimáticas de escuro para reduzir o CO₂ a carboidratos. Assim, os processos de quebra da molécula da água, captação de energia luminosa, produção de NADPH₂ e ATP e síntese de amido irão ocorrer nos cloroplastos, enquanto a síntese de sacarose no citosol de células foliares. Os nutrientes, como P, N, Ca, Mg, Mn, Zn e Fe, são essenciais, pois estabelecem uma estreita relação entre fotossíntese e nutrição mineral de plantas (Sun et al., 1989).

As reações de Hill, a fosforilação fotossintética (luminosas) e a fixação e

redução do CO_2 (no escuro), que ocorrem no processo de fotossíntese, são apresentadas na Figura 6.

Figura 6. Reações de Hill, a fosforilação fotossintética (luminosas) e a fixação e redução do CO_2 (no escuro).

Quando a luz atinge as plantas, o conteúdo de energia, no espectro do azul ao vermelho (comprimentos de ondas), é absorvido por moléculas de clorofila. Esta energia é então usada em vários processos. Parte é usada nas reações químicas da fotossíntese e parte é perdida através de processos que incluem aquecimento, perda de radiação por desexcitação e reemissão como luz ou fluorescência. Quando uma folha é iluminada em intensidade constante fluorecserá em um nível constante. No entanto, se uma folha é mantida no escuro por alguns minutos e em seguida iluminada, a fluorescência imediatamente aumentará de um nível F_0 , para um pico máximo, F_M , decrescendo gradualmente para um nível próximo ao F_0 original (F_0'). A cinética dessa resposta é chamada de “efeito Kautsky”. Isto será verdadeiro, se a intensidade de luz para a planta em estudo for saturante o receptor de elétrons Q_A (quinona A) estiver completamente

reduzido. A diferença entre o sinal de fluorescência máxima (F_M) e o sinal de nível mais baixo (F_0) é conhecida como o componente variável da fluorescência, ou fluorescência variável (F_V). De posse desses parâmetros pode-se calcular a relação F_V/F_M , ou seja a relação da fluorescência variável dividida pela fluorescência máxima, onde $F_V = (F_M - F_0)$. Essa relação é conhecida como Φ_P^{open} e apresenta grande valor para estudos de fisiologia de plantas (Krause & Weis, 1984; Genty et al., 1989; Kooten & Snel, 1990; Srivastava et al., 1995; Schreiber et al., 1995; Araus et al., 1998).

O Φ_P^{open} apresenta proporcionalidade com o rendimento quântico fotoquímico e também um alto grau de correlação com o rendimento quântico da fotossíntese líquida de folhas intactas (Harbinson et al., 1990). Esta relação é independente da área foliar e portanto a sua medição pode ser feita usando-se uma área conhecida da folha como amostra (Butler & Kitajima, 1975; Bjorkman & Demmig, 1987). Em termos de resposta fisiológica, o F_0 é afetado por qualquer estresse ambiental que venham a causar alterações estruturais no nível de pigmentos do PSII (Fotossistema II).

Danos por temperatura ao PSII são caracterizados por um drástico aumento no F_0 , enquanto que a fotoinibição resulta em pequeno aumento desse parâmetro. Danos aos tilacóides provocados por congelamento ou frio não afetam F_0 . Por outro lado, F_M é reduzido após exposição de folhas à temperaturas altas (Toivonen & Vidaver, 1988; Fernandez et al., 1997). Tratamentos severos de temperatura aumentam o F_0 e reduzem o F_M , que acompanham a inibição a nível de atividade do PSII. O F_V é normalmente reduzido por estresse ambiental que venham a causar danos aos tilacóides, tais como calor, frio ou congelamento e fotoinibição (Bilger & Schreiber, 1990; Trissl & Wilhelm, 1993). Consequentemente, o parâmetro Φ_P^{open} , que é uma estimativa da máxima eficiência do PSII quando todos os componentes do transporte de elétrons das membranas dos tilacóides se encontram no estado oxidado após período de escuro, e variam de 0 a 1, também reflete situações de estresse em plantas. Plantas consideradas saudáveis apresentam valores desse parâmetro superiores a 0,8, enquanto sintomas de estresse são caracterizados por valores inferiores a 0,6.

O Φ_P^{open} pode ser útil para monitorar respostas de plantas quanto à severidade de deficiências nutricionais (Sun et al., 1989), mas apresenta limitações quando se trata

de distinguir deficiências provocadas por nutrientes específicos. Constatou-se que parâmetros relacionados à fluorescência da clorofila foram reduzidos quando as concentrações de N, P, K e Mg decresceram, mas a eficiência da membrana dos tilacóides (F_v/F_m) permaneceu estável para todos os níveis de nutrientes testados.

Como visto anteriormente, a cadeia de elétrons produzirá NADPH e ATP, que serão usados para a fixação do CO_2 no ciclo de Calvin-Benson no cloroplasto. Tem sido verificado que as taxas de assimilação podem variar de acordo com a concentração de Pi. Baixa concentração de Pi pode restringir fotofosforilação, que resultaria em aumento da energização da membrana do tilacóide, decréscimo no fluxo de elétrons e inibição da fotossíntese (a relação Pi/ CO_2 é de 9:1) (Heineke et al., 1989; Harbinson et al., 1990; Plesnicar et al., 1994) (Figura 7).

Em alto nível de Pi, a exportação de triose fosfato compete com a regeneração de RuBP (ribulose 1,5-bisfosfato) e a taxa de fotossíntese pode ser diminuída. Experimentos com cloroplastos isolados sugerem que um ótimo de fotossíntese demanda um refinado balanço de Pi no citosol (Walker & Robinson, 1978).

A concentração de Pi é mantida pela sua entrada e saída do vacúolo e por processos metabólicos, resultando em mudanças na taxa de síntese de sacarose. Efeitos inibitórios de baixas concentrações de Pi, a longo prazo, também têm sido observados. Assimilação fotossintética do CO_2 foi inibida em plantas crescidas com insuficiente suprimento de Pi (Terry & Ulrich, 1973; Plesnicar et al., 1994). Deficiência de fosfato afetou marcadamente a eficiência de carboxilação e o rendimento quântico para assimilação do CO_2 por folhas de *Helianthus annuus*, *Zea mays* e *Triticum aestivum* deficientes em P (Jacob & Lawlor, 1992).

Figura 7. Transporte de elétrons , geração de ATP e NADPH_2 e fixação do CO_2 no cloroplasto (Matheus & van Holde, 1995)

A respeito da relação entre fotossíntese e sacarose, tem sido proposto que a retro-alimentação de sacarose ou hexose pode regular a atividade fotossintética por atuar a nível de expressão gênica (Stitt et al., 1990; Furbank et al., 1997). Nessa hipótese, a sacarose atuaria como um sinal negativo na expressão de genes fotossintéticos.

Recentemente, foi demonstrado que sacarose, dependendo da concentração, pode atuar como sinal negativo ou positivo e influenciar os níveis de proteína e capacidade fotossintética em plantas C_3 e C_4 (Goldschmidt & Huber, 1992; Furbank et al., 1997). A expressão de genes de invertase, em plantas de tabaco, resultou em aumento de carboidratos nas folhas, decréscimo do nível de enzimas do ciclo de Calvin-Benson, aumento de enzimas glicolíticas e inibição de fotossíntese (Stitt et al., 1990).

Estes autores sugerem que as mudanças provocadas nessas enzimas são mais importantes no ajuste dos altos níveis de carboidratos na folha do que a regulação por depressão de Pi ou alto níveis de metabólitos fosforilados.

Battistelli et al. (1991) encontraram forte correlação positiva entre o estado de ativação da SPS, enzima chave na síntese de sacarose, e taxas de assimilação do CO₂. Aumentos nas taxas de fotossíntese na ativação de SPS podem ser devidos a mudanças na disponibilidade de Pi ou à modificações na enzima como resultado do acúmulo de sacarose (Stitt et al., 1988; Galtier et al., 1993).

Taxas de fotossíntese em plantas micorrizadas são maiores em plantas não micorrizadas, podendo a resposta variar em função de fatores edáficos-climáticos, espécie de fungo, espécie ou variedade de planta hospedeira (Allen et al., 1981; Koch & Johnson, 1984; Smith, 1988; Mathur & Vyas, 1995; Lovelock et al., 1997). Os níveis de P no substrato e na planta podem concorrer para afetar significativamente as respostas em termos de fotossíntese e crescimento do hospedeiro e da relação entre os simbiontes. Observou-se que há um nível de colonização ótimo acima do qual a planta hospedeira não recebe aumento adicional de absorção de P (benefício), mas continua destinando carboidratos para atender o metabolismo da micorriza arbuscular (Douds et al., 1988). Esses autores encontraram que sistemas radiculares completamente colonizados (100%) não supriam mais P para as folhas do que sistemas radiculares parcialmente colonizados (50%), mas demandaram, em meio com alto nível de nutrientes, duas vezes mais fotoassimilados.

É de grande importância e aplicação prática associar ao estudo de fotossíntese outros parâmetros de fisiologia vegetal. As relações hídricas enquadram-se nesse caso, em função da estreita relação que existe entre elas e fotossíntese. Alterações bastante significativas dessas relações são verificadas quando plantas são inoculadas com fungos micorrízicos. No geral plantas micorrizadas, quando comparadas com o controle não inoculado, apresentam alta condutividade hidráulica, especialmente quando a disponibilidade de P é baixa. Resistências na parte aérea são frequentemente reduzidas, com o principal efeito ocorrendo nos estômatos. As taxas de movimento de CO₂ e H₂O são afetadas e as taxas de transpiração e fotossíntese, com base na área foliar, aumentam

(Smith, 1988). As mudanças na condutividade de raízes podem ser atribuídas em parte às alterações na superfície de raízes e presença de hifas. As micorrizas também atuam amenizando o estresse hídrico. No entanto tem sido difícil distinguir entre os efeitos diretos da micorriza e os devido à absorção de nutrientes, especialmente de P. Em plantas frutíferas de deserto, a inoculação com fungo micorrízico arbuscular aumentou a resistência estomática e reduziu a taxa de transpiração, aumentando a eficiência do uso da água (Mathur & Vyas, 1995).

Em contrapartida, Allen et al. (1981) verificaram maior transpiração em plantas micorrizadas, em relação ao controle, não colonizado. Ainda observaram que a taxa de depleção de água do solo não foi significativamente diferente entre os dois sistemas, o que sugere maior eficiência das plantas micorrizadas na utilização da umidade disponível no solo. Maiores taxas de transpiração em plantas micorrizadas têm sido verificadas também em plantas de citros (Levy & Krikun, 1980).

Provavelmente um dos pontos da ligação entre os parâmetros fenológicos e taxas de fotossíntese mencionados seja a regulação pela concentração de hexoses nas folhas e raízes (Glasziou, 1969; Rayle & Cleland, 1992; Roitsch & Tanner, 1995) (Figura 8). Assim a fotossíntese e síntese de sacarose poderiam ser reguladas pela concentração de hexoses que atuariam sobre genes repressores ou ativadores dos processos citados. Esta hipótese pressupõe a participação de uma invertase ácida. Além de envolvimento de invertase ácida é possível a participação de hormônios, especialmente auxinas, citocininas e ácido abscísico (ABA) (Glasziou, 1969; Chin Weston, 1975; Morris, 1982; Morris & Arthur, 1984; Ackerson, 1985; Morris & Arthur, 1985; Poovaiah & Veluthambi, 1985; Schaeffer et al., 1987; Weil & Rausch, 1990; Arai et al., 1991; Dickinson et al., 1991; Roitsch & Tanner, 1995; Schaeffer et al., 1995). É proposto que o ABA atue inibindo o crescimento ao promover redução da atividade de invertase ácida.

Figura 8. Regulação de crescimento mediada por hexose e invertase ácida (Jang & Sheen, 1994).

A regulação de crescimento pode ocorrer, também, pelo envolvimento de genes regulados pela concentração de carboidratos (Figura 9). Nessa hipótese, concentrações altas de carboidratos levaria a ativação de genes que favoreceriam reserva e utilização na região de dreno, ao mesmo tempo que ativaria genes que limitariam taxas de fotossíntese. Por outro lado, depleções nas concentrações de carboidratos aumentariam a expressão de genes relacionados aos processos de fotossíntese, reserva, mobilização e exportação (Koch, 1996).

Figura 9. Expressão de genes modulados por carboidratos (Koch, 1996).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 EXPERIMENTO 1

Esse experimento foi instalado em casa de vegetação, como parte do projeto que visava estudar depressão de crescimento em porta-enxertos cítricos micorrizados com fungos micorrízicos arbusculares em doses altas de fósforo. Estudou-se os seguintes fatores: 1. Doses de P (0, 200, 400, 600 e 800 mg kg⁻¹);

2. Porta-enxertos cítricos: Limoeiro cravo (*Citrus limonia* (L.) Osbeck); Laranja caipira (*C. sinensis* (L.) Osbeck); Tangerina Cleópatra (*C. reshui* Hort. ex Tanaka, cv. Cleópatra);

3. Inoculação: plantas não inoculadas (controle, sem fungo micorrízico); plantas inoculadas com *Glomus clarum* Nicolson & Schenck; plantas inoculadas com *G. intraradices* Schenck & Smith. Usou-se delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. O substrato usado foi uma mistura de solo (Areia Quartzosa da Série Paredão Vermelho) e areia de rio lavada, na proporção de 3:1 (v/v). O substrato foi autoclavado (120°C/2h) e corrigido com calcário dolomítico, considerando-se 65 % de saturação de base. Possuía as seguintes características químicas: pH CaCl₂ 4,0; matéria orgânica 2,0 g dm⁻³; P 5,0 mg dm⁻³; S-SO₄, K⁺, Ca²⁺, Mg³⁺, H+Al³⁺, saturação de bases (SB), e CTC, respectivamente 28,5; 0,5; 7,0; 2,0; 34,0; 10,0 e 44,0 mmolc dm⁻³; V 23 %; m 44 %; B, Cu, Fe, Mn, Zn e Na, respectivamente, 0,48; 0,42; 66; 0,48; 3,8; 4,6 mg kg⁻¹.

A adubação básica com macronutrientes foi realizada de acordo com Antunes & Cardoso (1991), com 50 mg k⁻¹ (na forma de KCl), 45 mg kg⁻¹ de Mg (na forma de MgSO₄ 7H₂O), 46 mg kg⁻¹ de S e 40 mg kg⁻¹ de N, usando-se como fonte desses elementos o (NH₄)₂SO₄; os micronutrientes foram supridos através da adição de solução

de Hoagland (1950), sem Mn, usando-se 1,0 mL de solução por vaso de 8,0 kg, (1 planta/vaso). O P foi fornecido na forma de superfosfato triplo moído.

Esse experimento fez parte da tese de Vânia Freire Gomes (Gomes, 1997). Para a presente tese, parte do mesmo projeto da tese anterior, usou-se apenas os tratamentos correspondentes ao porta-enxerto tangerina cleópatra, inoculado ou não com *G. intraradices*, nas doses de 0, 200, 400, 600 e 800 mg kg⁻¹. Essas plantas foram usadas para avaliação do Φ_P^{open} , um parâmetro relacionado à fluorescência da clorofila a, que é descrito abaixo:

1 Fluorescência da clorofila

Quatro meses após o transplântio foram realizadas sete avaliações de Φ_P^{open} de quinze em quinze dias. Esse parâmetro mede a capacidade máxima de captação de energia pelo fotossistema II (PSII) localizado nas membranas dos tilacóides no cloroplasto e pode ser medido usando-se fluorímetros. Antes das avaliações as plantas eram deixadas no escuro por 15 minutos e, em seguida, folhas intactas submetidas à exposição de luz com intensidade de 1600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Após medição das fluorescência máxima (F_M) e fluorescência mínima (F_0), o Φ_P^{open} foi calculado pela relação $F_M - F_0 / F_M$ (Schreiber et al., 1986; van Kooten & Snel, 1990). O esquema de registro dos parâmetros descritos anteriormente, são apresentados na Figura 10, onde as distâncias gráficas limitadas pelas setas serviram de base para o cálculo de Φ_P^{open} .

O F_0 corresponde a fluorescência mínima, ou seja a intensidade de fluorescência com todos os centros de reação do PSII abertos enquanto a membrana do tilacóide está no estado não energizado, isto é, adaptada no escuro; o F_M é a fluorescência máxima, ou seja a intensidade de fluorescência obtida quando todos os centros de reação do PSII estão fechados no estado adaptado no escuro e recebem um pulso de luz saturante.

Figura 10. Representação gráfica dos parâmetros de fluorescência da clorofila a, F_0 e F_M .

3.1.2 EXPERIMENTO 2

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Departamento de Solos e Nutrição de Plantas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Usou-se vasos com capacidade de 3 L e como substrato, uma mistura de solo arenoso (Areia Quartzosa da Série Paredão Vermelho) e areia lavada, na proporção de 3:1. O substrato, após autoclavado foi corrigido com calcário dolomítico PRNT 131, considerando-se 65% de saturação de base. As características químicas do substrato usado são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Características químicas dos substratos usados nos experimentos.

Características	Valores	
	Experimento 1	Experimento 2
pH (CaCl ₂)	4,0	5,3
M.O. (g dm ⁻³)	12,0	67,0
P (mg dm ⁻³)	5,0	15,0
Cátions	(mmolc dm ⁻³)	
S-SO ₄	24,8	38,24
K ⁺	0,4	1,1
Ca ²⁺	3,0	150,0
Mg ²⁺	1,0	9,0
Al ³⁺	6,0	0,0
H ⁺ + Al ³⁺	31,0	25,0
SB	4,4	160,1
T	35,4	185,1
Teores	(%)	
V	12,0	86,0
M	58,0	0,0
Micronutrientes	(mg kg ⁻¹)	
B	0,1	0,4
Cu	0,4	0,1
Fe	53,5	24,0
Mn	4,3	14,8
Na	4,6	41,4
Zn	0,8	2,6

Como adubação de base utilizou-se N (40 mg kg⁻¹ de NH₄NO₃) e micronutrientes supridos através da solução de Hoagland & Arnon (1950), sem Mn, utilizando-se 1 mL de solução por vaso. As doses de P (0, 200, 400, 600 e 800 mg kg⁻¹) foram fornecidas usando-se superfosfato triplo (SFT) moído. As características químicas do SFT usado são apresentadas na Tabela 2.

Usou-se o porta-enxerto Tangerineira Cleópatra (*C. resini* Hort. ex Tanaka), sem inóculo (Controle) e inoculado com Fungo Micorrízico Arbuscular (FMA) (*G. intraradices* Schenck & Smith), aplicando-se 20 g de inóculo por vaso. As mudas do porta-enxerto foram produzidas em sementeiras e transplantadas para os vasos com 60

dias de idade. O experimento foi instalado obedecendo delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com cinco repetições.

Tabela 2. Características químicas do super fosfato triplo (SFT) utilizado no experimento.

Nutrientes	Solubilidade	(%)
Fósforo	P ₂ O ₅ (total)	47,20
	P ₂ O ₅ (água)	40,07
	P ₂ O ₅ (*CNA+água)	43,70
	P ₂ O ₅ (ácido cítrico)	40,85
Potássio	K ₂ O (água)	0,00
Cálcio	Ca (total)	15,40

* CNA: Citrato neutro de amônio

Ao longo do experimento foram medidas taxas de fotossíntese e fluorescência da clorofila. Seis meses após o transplântio das mudas o experimento foi avaliado e colhido. As seguintes variáveis de resposta foram consideradas:

a. Altura de Plantas: a altura das plantas foi medida do colo ao meristema apical, 6 meses após o transplântio das mudas;

b. Massa seca da parte aérea: folhas e caules, colhidos 6 meses após o transplântio, foram secos em estufa de ventilação forçada a 65°C por 72 horas e pesados em seguida;

c. Área foliar: foi obtida a partir da coleta de 60 discos foliares, com vasadores de diâmetro conhecido(1 e 5 cm⁻²). Estes discos foliares foram secados em estufa a 65°C por 72 horas e pesados em seguida. A área foliar foi calculada com base na massa dos discos foliares coletados e na massa total de folhas por planta e os resultados expressos em cm². A avaliação foi realizada 6 meses após o transplântio das mudas;

d. Colonização radicular interna: as raízes foram coletadas, cortadas e coradas pelo método de coloração e clarificação de Phillips & Hayman (1970). A quantificação da colonização foi feita pelo método de Giovannetti & Mosse (1980) e Bethlenfalvay et al. (1981);

e. Micélio extrarradicular ativo (MEA): foi obtido a partir de 10 g de solo, usando-se metodologia descrita por Schubert (1987), Sylvia (1988), Cardoso Filho (1994) e modificado por Melloni (1996). Este método é baseado na produção de fluorescência induzida pela ação de diacetato de fluoresceína (FDA) ao reagir com segmentos de micélio ativo do fungo. A avaliação foi realizada ao final do experimento, seis meses após o transplântio das mudas. Usou-se a equação de Newman (1966) para se calcular o comprimento de MEA, corrigida pelo teor de água do substrato e volumes das alíquotas;

f. Taxas de fotossíntese: foram medidas aos quatro e seis meses após o transplântio, usando-se 5 discos foliares coletados com vasadores de 1 cm², totalizando uma área de 5 cm². Em uma câmara fechada, foram postos os discos foliares sobre feltro umedecido com soluções de bicarbonato de sódio 1 M e carbonato de sódio 1 M, usadas como fonte de CO₂ (Eq. 1). O O₂ liberado pela fotossíntese (Eq. 2) é reduzido (Eq. 3 e 4) no eletrodo (cátodo de platina e ânodo de prata), equações descritas na Figura 12. A corrente elétrica gerada para a redução do O₂ é convertida em voltagem, o sinal captado por um aparelho Hansatech CB1-D é registrado à pena em registrador Lineal. Na Figura 11, é apresentado o esquema de registro de dados e os parâmetros para base de cálculo da liberação do O₂, expresso em $\mu\text{molO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Walker, 1990).

3.3 EXPERIMENTO 3

O Experimento 3 foi realizado em condições semelhantes às descritas para o Experimento 2. As plantas cultivadas com a dose 0 mg kg⁻¹ de P morreram. As avaliações foram realizadas nos tratamentos com plantas inoculadas ou não com *G. intraradices* e nas doses 200, 400, 600 e 800 mg kg⁻¹ de P de substrato. Foram avaliadas as seguintes variáveis de resposta: 1. Altura de plantas; 2. Colonização radicular interna; 3. Micélio extrarradicular ativo; 4. Diâmetro de entre-nós; 5. Taxa de fotossíntese.

Figura 11. Eletrodo de O₂ e aparelho marca Hansatech para calibração e recepção de impulsos elétricos. Registro de dados.

Figura 12. Base química do uso da liberação de O_2 para estimar taxa de fotossíntese (Walker, 1990)..

3.4 EXPERIMENTOS 4 e 5

Esses experimentos foram instalados considerando a mesma metodologia apresentada para o Experimento 2. Como não haviam, no período de instalação, mudas do porta-enxerto tangerina cleópatra, decidiu-se usar no Experimento 4, outro porta-enxerto igualmente suscetível à depressão de crescimento quando inoculado com *G. intraradices*, no caso limão cravo. As doses de P (25, 50, 150, 250 e 500 mg kg⁻¹) usadas, foram baseadas em dados obtidos em experimentos preliminares que buscavam o melhor modelo para se estudar depressão de crescimento em porta-enxerto cítricos (Melloni, 1996; Gomes, 1997). Essas plantas, após a primeira avaliação de taxa de fotossíntese, usando-se eletrodo de O_2 , morreram em função de elevada temperatura no interior da casa de vegetação, após um período de ausência de energia elétrica.

Os únicos dados obtidos nesse experimento foram as taxa de fotossíntese usando-se eletrodo de O_2 . As análises de transpiração e resistência estomática foram realizadas preliminarmente no Experimento 5, instalado com o mesmo objetivo do Experimento 4. Nesse caso, as plantas foram avaliadas 3 meses após o transplântio, no interior da casa de vegetação, em dias sem nebulosidade, no período de 9 às 12 horas da manhã, usando-se Porômetro marca LI-1600. Usou-se tangerina cleópatra como porta-enxerto,

inoculado ou não com *G. intraradices*. As doses de P foram: 0, 50, 100, 150, 200 e 250 mg kg⁻¹ de P.

Figura 13. Resumo geral da metodologia dos experimentos 1, 2, 3, 4, e 5.

3.5 EXPERIMENTO 6

Este experimento foi realizado no Departamento de Botânica da Universidade de Tübingen, Alemanha, e teve como objetivo estudar o metabolismo relacionado à síntese de sacarose e sua relação com a depressão de crescimento em porta-enxerto cítrico. Para isso, instalou-se o Experimento 6 seguindo o modelo anteriormente adotado:

- Porta-enxerto cítrico: Limão Cravo (*C. limonia* (L.) Osbeck);
- Inoculação com fungo micorrízico arbuscular (*G. intraradices*) e Controle (sem fungo micorrízico arbuscular);

- c. Níveis de P (50, 200, 400 e 800 mg kg⁻¹), usando-se Superfosfato Simples (SFS) moído como fonte de P;
- d. Delineamento Estatístico e Número de repetições: Inteiramente Casualizado, em esquema fatorial com 5 repetições.

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação, a 28 °C e fotoperiodismo (16 h de luz/8 h de escuro) controlados. A adubação básica com N, K e micronutrientes seguiu recomendações mencionadas no Experimento 1. Na Tabela 1 foram apresentadas as características químicas do substrato usado.

As plantas foram colhidas aos 6 meses após o transplântio, e antes da colheita procedeu-se a avaliação da assimilação do CO₂ e altura de plantas. Durante a colheita, pesaram-se os pares de folhas novas e velhas (um par de cada tipo) usados na avaliação da assimilação do CO₂ (Gas Exchange). Separou-se a parte aérea das raízes, e, após pesadas as amostras de folhas e raízes, foram imediatamente colocadas em nitrogênio líquido, com exceção de metade do sistema radicular que foi separado para avaliação da colonização. As amostras de folhas e raízes em nitrogênio líquido foram conservadas a -80 °C e, posteriormente homogeneizadas, usando-se microdesmembrador (Braun, Melsngen, FRG) e liofilizadas a -30 °C em sistema descrito por Hampp et al. (1987) e mantidas a vácuo a -20 °C até o uso.

As seguintes avaliações e análises foram realizadas:

a. Altura de Plantas: como descrito no Experimento 2;

b. Massa Fresca da Parte Aérea e de Raízes: pesados direta e imediatamente após colheita do experimento;

c. Relação Massa Fresca da Parte Aérea (MFA)/Massa Fresca de Raízes (MFR): foi calculada dividindo-se as massas frescas correspondentes (MFA/MFR);

d. Assimilação do CO₂: foi medida usando-se sistema de câmara aberta acoplada a Porômetro CO₂/H₂O, em combinação com analisador infravermelho de gás

(Figura 14) (Caemmerer & Farquhar, 1981). As avaliações foram feitas no escuro (Dark Respiration) e a $1.000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (intensidade luminosa), em folhas novas e folhas velhas de plantas intactas. Para definir a intensidade de luz usada, determinou-se taxas de fotossíntese em folhas novas e velhas, usando-se diferentes intensidades luminosas entre 0 a $2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Figura 14. Detalhes do Experimento 6: 1. Visto geral do experimento; 2. Homogeneizador; 3. Vista geral do liofilizador; 4. Amostras sendo liofilizadas; 5. Vista geral dos equipamentos para medir a assimilação do CO_2 ; 6. Análise de assimilação de CO_2 para folha de citros (câmara aberta); 7. Sistema microtiter

plate para análise enzimática (à esquerda: placa com amostras em fotômetro; à direita: cinética das reações enzimáticas captadas, gravadas e apresentadas em computador).

e. Glucose, Frutose e Sacarose: avaliados na parte aérea e raízes, usando-se 5 mg de tecido vegetal homogeneizado e liofilizado (powder), 20 mg de carvão ativado e extração com etanol 65 % e centrifugação a $10.000 \times g/5$ minutos a 4°C . Para análise foi usado o sistema microtiter plate com quatro reações paralelas, onde se usaram 10 μL de extrato (foliar ou radicular), imidazol 1 M pH 6,9, ATP 40 mM, NADP 20 mM, MgCl_2 50 mM, DTT 5 mM, EDTA 10 mM e as enzimas glicose 6-P desidrogenase, hexokinase, fosfoglicose isomerase e β -frutosidase. As leituras foram realizadas em fotômetro a 340 nm de comprimento de onda (Egger & Hampp, 1993; Egger, 1993; Egger et al., 1996). O esquema de reação que fundamentou a análises dos carboidratos mencionados, encontra-se na Figura 15.

Figura 15. Esquema de reação que fundamentou a análise enzimática de glicose, frutose e sacarose.

e. Amido: avaliado na parte aérea e raízes, a partir 5 mg de tecido vegetal homogeneizado e liofilizado e extração com NaOH 500 mM em banho-maria ($95^{\circ}\text{C}/5$ minutos) e ajuste do pH do extrato com ácido acético 1M. Em sistema Microtiter Plate usou-se 10 μL de extrato, obtido por centrifugação ($10\,000 \times g/5$ minutos a 4°C), Tris-HCl 2M (pH 8,8), MgCl_2 1M, DTT 100 mM, acetato 100 mM pH 4,6, ATP 100 mM,

NADP 100 Mm e as enzimas glicose 6-P desidrogenase, hexokinase (Figura 16). As leituras foram realizadas em fotômetro a 340 nm de comprimento de onda (Egger & Hampp, 1993; Egger, 1993; Egger et al., 1996).

Figura 16. Esquema de reação que fundamentou a análise enzimática de amido.

g. Fosfato Inorgânico (Pi): foi analisado na parte aérea e raízes a partir de 5 mg de tecido vegetal homogeneizado e liofilizado, extração com Tris (100 mM)/ácido bórico (300 mM) pH 7,2, β-mercaptoetanol 0,1 %, 50 mg de PVPP insolúvel, 5 mg/mL de carvão ativado e centrifugação a 10 000 x g/5 minutos a 4 °C. Para análise foram usados 10 µL de extrato, imidazol 150 mM pH 7, AMP 20 mM, EDTA 100 mM, acetato de Mg 100 mM, glicose 1,6 bisfosfato 1mM e como padrão K₂HPO₄ 1M. As leituras foram realizadas em fotômetro a 340 nm de comprimento de onda (Egger & Hampp, 1993; Egger, 1993; Egger et al., 1996). Na Figura 17 é apresentado o esquema de reações que fundamentaram a análise de Pi.

Figura 17. Esquema de reação que fundamentou a análise de Pi.

h. Sacarose Sintase (SuSy) (EC 2.4.1.13): avaliada em folhas e raízes a partir de 6 mg de tecido vegetal homogeneizado e liofilizado, usando-se para extração Tris (100 mM)/ácido bórico (300 mM) pH 7,2, 50 mg PVPP insolúvel, 5 mg/mL de carvão ativado, β -mercaptoetanol 0,1 %, incubação por 10 minutos e centrifugação a 10 000 x g/5 minutos a 4 °C. Para determinação, em sistema Microtiter Plate, usaram-se 10 μ L de extrato, sacarose 1 M, trietanolamino-hidroxiclорídrico (TRA) 0,6 M, glicose 6-P desidrogenase, hexokinase, fosfoglicose isomerase e como iniciadora da reação UDP 50 mM. As leituras foram realizadas em fotômetro a 340 nm de comprimento de onda (Egger & Hampp, 1993; Egger, 1993; Egger et al., 1996). O esquema de reações que fundamentaram a análise de sacarose sintase é apresentado na Figura 18.

Figura 18. Esquema de reação que fundamentou a análise enzimática de sacarose sintase.

i. Invertase (EC 3.2.1.26): avaliada nas raízes a partir de 6 mg de tecido vegetal homogeneizado e liofilizado, usando-se para extração o mesmo procedimento descrito para sacarose sintase. Para determinação, em sistema Microtiter Plate, usaram-se 10 μ L de extrato, 40 μ L de tampão ácido cítrico (100 mM)/fósfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mM),

pH 3,8, sacarose 1 M, incubação com NaOH 670 mM a 30 °C/90 minutos e 100 °C/15 minutos, imidazol 1 M pH 6,9, ATP 40 mM, NADP 20 mM, MgCl₂ 50 mM, DTT 5 mM, EDTA 10 mM e as enzimas glicose 6-P desidrogenase (1:200), hexokinase (1:200), fosfoglicose isomerase (1:500). Como padrões, usou-se glicose 1 mM, frutose 1 mM e sacarose 1 mM. As leituras foram realizadas em fotômetro a 340 nm de comprimento de onda (Egger & Hampp, 1993; Egger, 1993; Egger et al., 1996). Para detalhamento das reações que fundamentaram a análise de invertase ver Figura 19.

Figura 19. Esquema de reação que fundamentou a análise enzimática de invertase.

j. Sacarose Fosfato Sintase (SPS) (EC 2.4.1.14): foi avaliada em tecido foliar a partir de 6 mg de material homogeneizado e liofilizado. Para extração usou-se Tris (100 mM)/ácido bórico (300 mM) pH 7,6, 50 mg PVPP insolúvel, 5 mg/mL de carvão ativado, β-mercaptoetanol 0,1 %, incubação por 10 minutos e centrifugação a 10 000 x g/5 minutos a 4 °C. Para determinação, em sistema Microtiter Plate, usaram-se 10 µL de extrato, frutose 6-fosfato 100 mM, glicose 6-fosfato 100 mM, MOPS 500 mM, MgCl₂ 1 M, NADH 100 mM, PEP 100 mM, lactato desidrogenase, piruvato kinase e como iniciadora da reação UDP glicose 50 mM. As leituras foram realizadas em fotômetro a 340 nm de comprimento de onda (Egger & Hampp, 1993; Egger, 1993; Egger et al., 1996). O esquema das reações que fundamentaram a análise enzimática de SPS é mostrado na Figura 20.

Figura 20. Esquema de reação que fundamentou a análise enzimática de sacarose fosfato sintase.

1. Grau de Ativação da SPS: usou-se o mesmo procedimento descrito anteriormente para SPS. Na determinação, foram usadas diferentes concentrações do substrato frutose 6-fosfato (0,25, 0,5, 1, 2 e 10 mM) e diferentes concentrações do ativador alostérico glicose 6-fosfato (0, 1, 2, 3, 5, 20 mM), adicionando-se 20 mM de gluconato 6-fosfato, com o objetivo de inibir a atividade de fosfoglicose isomerase. Após adição do substrato UDP glicose as reações foram iniciadas e as leituras realizadas em fotômetro a 340 nm de comprimento de onda. Após os cálculos das atividades da enzima, calculou-se os K_m e V_{max} para frutose 6-fosfato em presença do ativador alostérico glicose 6-fosfato. Usou-se amostra de tecido foliar na dose de 800 mg kg^{-1} de P (Egger & Hampp, 1993; Egger, 1993; Egger et al., 1996).

m. Colonização radicular interna: como descrito no Experimento 1.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada segundo modelo matemático aplicado à delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial. Para que os modelos de análise usados tenham validade e os testes tenham poder, foi necessário satisfazer as pressuposições:

- a. Homogeneidade de variâncias, ou seja, só podem ser comparados tratamentos com variâncias homogêneas entre si;
- b. Independência dos erros;
- c. Erros com distribuição normal (ou aproximadamente normal).

Para testar essas pressuposições foi realizada análise exploratória dos dados. Os detalhes das análises realizadas para cada experimento são apresentados abaixo:

a. Experimento 1: para análise da variável Φ_p^{open} usou-se parcela subdividida, considerando-se tempo como fator. Para os fatores doses de P (mg kg^{-1}) e tempo (dias), fez-se análise de regressão e para as demais variáveis aplicou-se o teste de Tukey a 5 %;

b. Experimentos 2, 3, 4 e 5: análise de variância, teste de médias (Tukey a 5%) para comparar Controle e *G. intrarradices* e análise de regressão para as doses de P (mg kg^{-1});

c. Experimento 6: para sacarose fosfato sintase e invertase, as análises de variância, teste de médias (Tukey 5%) e de regressão para as doses de P (mg kg^{-1}), foram realizadas a partir de dados transformados por $\log x$, que teve por objetivo estabilizar a heterogeneidade de variância apresentada por essas variáveis.

Em todos os experimentos, e para todas as variáveis quantitativas que não apresentaram resposta significativa pela análise de regressão, os dados apresentados em gráficos não possuem curvas de tendência. Para o teste de Tukey, médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem entre si ao nível de 5 % (*) ou 1 % (**). A sigla MS, nas legendas dos gráficos do experimento 6, significa valores expressos com base na massa seca.

Figura 21. Resumo geral da metodologia apresentada para o experimento 6.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse tópico serão apresentados e discutidos os resultados em três blocos: 1. Os resultados dos Experimentos 1, 2, 3, 4 e 5, realizados no Brasil, apresentando-se e discutindo-se, em conjunto, as variáveis comuns a estes experimentos; 2. Os resultados encontrados no experimento realizado na Alemanha (Experimento 6); 3. Serão discutidos dados de todos os experimentos em conjunto, com o objetivo de entender o porquê da depressão de crescimento em mudas de porta-enxertos cítricos micorrizados em doses altas de P.

4.1. Experimentos 1, 2, 3, 4 e 5

4.1.1. Altura de plantas

Nas Figura 22 A-B são apresentados as avaliações de altura de plantas. Pode-se observar os efeitos significativos tanto das doses de P, da inoculação ou não com fungo micorrízico arbuscular (FMA), bem como da interação entre esses dois fatores nessa variável. A inoculação dos porta-enxertos cítricos com *Glomus intraradices*, em doses mais baixas de P, resultou em aumento de altura, enquanto que o efeito contrário foi observado nos tratamentos inoculados com o aumento das doses de P acima de 200 mg kg⁻¹, onde a altura de plantas foi significativamente reduzida. Em termos práticos, não seriam recomendadas doses de P superiores a 200 mg kg⁻¹ para a produção de porta-enxertos cítricos inoculados com FMA. Sendo assim, a prática da inoculação com FMA por si só pode substituir no mínimo 100 mg kg⁻¹ de P, o que, considerando-se os

problemas relacionados à fixação de fósforo em solos tropicais e os custos da adubação fosfatada, é um benefício bastante significativo. Além da economia de P, que nesse estudo seria da ordem de 500 kg ha^{-1} de superfosfato triplo, plantas inoculadas levariam menos tempo para atingirem o ponto adequado de enxertia e, conseqüentemente menos tempo no viveiro. Seriam mais tolerantes a transplântio, mais resistentes a deficiências hídricas, mais tolerantes a estresse abiótico resultante de níveis tóxicos de elementos como alumínio e manganês, além da minimização da ação de pragas e doenças de importância econômica. Tem sido reportado o efeito da inoculação com FMA na redução dos danos causados por nematóides, o que é de grande importância prática, em função das dificuldades e dos custos de controle dessa praga, principalmente em solos de textura arenosa onde os danos tendem a ser muito severos. O efeito da micorriza, em doses baixas de P, favorecendo altura de plantas está bem estabelecido na literatura e é resultado de um conjunto de fatores, dentre eles destacando-se aumento na absorção de macro e micronutrientes, melhorias nas relações hídricas e aumento na eficiência do uso da umidade do solo, produção de hormônios e aumento das taxas de fotossíntese (Marschner, 1995; Loverlock et al., 1997).

Os benefícios da inoculação nas doses mais baixas de P variaram de 16 a 82 %, enquanto que a redução média na altura foi de 33 %. A altura máxima de planta foi atingida com 668 e 228 mg de P kg^{-1} , em plantas sem inoculação e inoculadas com FMA. Isto significa que, comparado à produção sem inoculação, é possível economizar 66 % do P ao se produzir mudas inoculadas com FMA, em outras palavras, seria necessário adicionar quase três vezes mais P para se produzir plantas com o mesmo padrão de altura encontrado em plantas inoculadas.

4.1.2. Massa seca da parte aérea

A produção de massa seca, à semelhança da altura de plantas, foi igualmente influenciada pelas doses de P e inoculação com FMA (Figura 23). Os aumentos verificados na produção de massa seca como resultado de P e presença de FMA são

resultados de benefícios nutricionais, hormonais e, provavelmente, deveu-se a uma maior produção de fotoassimilados produzidos pelo estímulo positivo desses fatores nos

Tratamentos	P (mg kg ⁻¹)				
	50	200	400	600	800
A) Altura de plantas (cm)					
Controle	16,17 b**	38,03 b*	45,67 a**	42,97 a**	39,67 a**
<i>G. intraradices</i>	29,50 a**	44,00 a*	32,03 b**	25,50 b**	28,50 b**
B) Altura de plantas (cm)					
Controle	-	14,37 a	18,37 a	18,73 b**	49,30 a**
<i>G. intraradices</i>	-	14,50 a	18,33 a	24,10 a**	36,00 b**

Figura 22 A-B. Alturas de porta-enxerto cítrico (tangerina cleópatra), em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 4 repetições.

mecanismos de fotossíntese da planta hospedeira. Em dose alta de P, a presença de FMA resultou em reduções significativas de produção de massa seca, acompanhando tendência observada na altura de plantas. Na dose mais baixa de P o ganho de massa seca resultante da inoculação com FMA foi de 161 %, comparável à produção conseguida com 600 mg de P kg⁻¹, ou seja a inoculação com fungo micorrízico arbuscular foi capaz de substituir 600 mg de P kg⁻¹ ou 1200 kg de P ha⁻¹. A título de ilustração, isto significaria

aproximadamente 1374 kg P₂O₅ ha⁻¹, ou 6000 kg de superfosfato triplo por hectare, com uma economia de 2000 reais por hectare. Um viveirista produzindo 2.000.000 de mudas em 100 ha, economizaria R\$ 232.000,00. Com o aumento das doses de P, a produção de massa seca das plantas inoculadas foi reduzida de 31 a 61 %, em relação ao tratamento sem P e sem FMA, com uma redução média de 45 %.

A máxima produção de massa seca foi atingida, para plantas não inoculadas, com a adição de 590 mg kg⁻¹, enquanto que a inoculação reduziu essa dose para 360 mg de P kg⁻¹. Essas reduções em massa seca têm sido atribuídas a níveis tóxicos de P e a efeito hormonal (Gerdemann, 1968; Mosse, 1973). Ambas as hipóteses parecem não ser suficientes para explicar o fenômeno e carecem de comprovação. Experimentos que tratam da depressão de crescimento não relatam sintomas visuais de toxidez de P e os estudos de hormônios em micorriza arbuscular são ainda escassos e controversos.

Tratamentos	P (mg kg ⁻¹)				
	50	200	400	600	800
Massa seca da parte aérea (g)					
Controle	1,59 b**	7,46 a**	9,75 a**	8,38 a**	8,02 a**
<i>G. intraradices</i>	4,15 a**	5,11 b**	3,77 b**	4,23 b**	5,07 b**

Figura 23. Massa seca da parte aérea para tangerina Cleópatra, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 5 repetições.

4.1.2. Área foliar

A área foliar de porta-enxerto cítrico pode ser aumentada pela inoculação com FMA (Figura 24). Aumentos médios de 84 % foram obtidos nesse tratamento, decrescendo o benefício com o aumento das doses de P. Aumento de área foliar pode significar aumentos na superfície de captação de luz, aumento em assimilação de CO₂ e produção de fotoassimilados, necessária para atender a demanda do sistema micorrízico e da planta hospedeira (Peng et al., 1993; Shachar-Hill et al., 1995). Tem sido proposto que este tipo de benefício é resultante do aumento na absorção de nutrientes e água pelo FMA e suas implicações a nível fisiológico e bioquímico (síntese de hormônios, aminoácidos e proteínas e fotoassimilados).

As reduções de área foliar de tangerina cleópatra, em presença de FMA e a partir de 500 mg de P kg⁻¹ de substrato, chegaram em média a 32 %, variando de 27 a 52 %. Essa depressão na área foliar deve resultar em redução de fotossíntese e, conseqüentemente de produção de fotoassimilados, o que levará inevitavelmente a um ajuste do sistema da relação planta hospedeira-FMA a esse novo nível de produção de fonte de energia (carbono). É de se esperar que nessa condição, para atender os pressupostos da relação mutualística, haja restrição imposta pelo hospedeiro à colonização radicular interna, cujo custo em carbono é relativamente alto. O resultado deverá ser a manutenção de estruturas extrarradicais ativas no sistema, que continuará demandando carboidratos do hospedeiro, mas menos intensamente. Além disso, a contrapartida por parte do fungo micorrízico, em termos de P, pode não ocorrer na mesma proporção que o fornecimento de carboidratos do hospedeiro, ou seja o hospedeiro pode continuar fornecendo carboidrato sem que haja contribuição adicional em P por parte do FMA (Douds et al., 1988).

Tratamentos	P (mg kg ⁻¹)				
	50	200	400	600	800
Área foliar (cm ²)					
Controle	0,63 b*	6,64 a	4,47 b**	7,32 a**	6,28 a**
<i>G. intraradices</i>	1,84 a*	7,28 a	6,78 a**	4,61 b**	4,59 b**

Figura 24. Área foliar para tangerina Cleópatra, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 4 repetições.

4.1.4. Distância de internódios

É interessante verificar que com o aumento das doses de P há redução significativa da distância do internódios de tangerina cleópatra (Figura 25). Essa redução foi em média de 21 %, comparada às plantas não inoculadas. Redução de internódios pode significar alteração do balanço hormonal do hospedeiro, ou mais especificamente redução de síntese de auxina (ou da relação auxina/citocinina), desativação parcial dos mecanismos de alongamento celular, desbalanço esse que pode ter como uma das causas

o desbalanço nutricional. A redução observada nos internódios de tangerina cleópatra em doses altas de P é coerente com a redução em altura de plantas nessa mesma condição.

Figura 25. Distância de internódios para tangerina Cleópatra, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 4 repetições.

4.1.5. Colonização radicular interna e micélio extrarradicular ativo

A colonização radicular interna foi drasticamente reduzida com o aumento das doses de P, chegando em doses superiores a 600 mg kg⁻¹ de P a limites não detectáveis pelo método usado, considerados como zero (0) (Figura 26 A-B). Provavelmente o método usado não foi o mais adequado para a quantificação de colonização interna nessa condição de dose alta de P, uma vez que a probabilidade de se detectar infecção em

segmentos de raízes torna-se mais reduzida, aumentando a chance de erros. Métodos bioquímicos ou moleculares talvez pudessem expressar com mais fidelidade a realidade do sistema em estudo.

Figura 26 A-B. Colonização radicular interna para tangerina Cleópatra colonizado com FMA, em função doses de P. Média de 3 repetições.

As reduções na colonização radicular interna têm sido frequentemente verificadas (Melloni, 1996; Gomes, 1997) e as causas e mecanismos de regulação continuam sendo terreno fértil para controvérsias. A influência do P alterando a permeabilidade da membrana celular das raízes do hospedeiro, alterando a anatomia da raiz (tornando-a mais resistente à penetração), aumentando ou reduzindo a disponibilidade de carboidratos na raiz, são algumas das hipóteses encontradas na literatura (Dehne, 1986; Amijee et al., 1990; Bécard et al., 1991).

Apesar da redução drástica da colonização interna, observa-se aumento do comprimento do micélio extrarradical ativo à medida que aumenta a dose de P (Figura 27 A-B). A existência de micélio ativo pode ser indicativo de dreno ativo de carboidrato a ser suprido pela planta hospedeira. Assim, uma possível competição estabelecida pela presença de estruturas do fungo, que demandaria carboidrato para a sua manutenção e crescimento, resultaria em depressão de crescimento da planta hospedeira. No entanto, mesmo que isto ocorra, resta saber quais os mecanismos que concorrem para

desestabilizar a simbiose, favorecendo o fungo em detrimento do hospedeiro, e porque uma vez havendo disponibilidade de carbono, não ocorre contrapartida por parte do fungo, beneficiando o sistema como um todo. Uma outra questão é se o aumento da quantidade de micélio extrarradicular é suficiente para estabelecer uma força de dreno que venha a comprometer o crescimento e desenvolvimento do hospedeiro. Era de se esperar que alta colonização radicular, e não baixa, viesse a favorecer o estabelecimento de dreno de carboidrato e concorrer para reduzir o crescimento e produção da planta

Tratamentos	P (mg kg ⁻¹)				
	50	200	400	600	800
A) Micélio extrarradicular ativo (mg g⁻¹ de substrato)					
Controle	-	0,26 b**	0,45 b**	0,37 b**	0,37 b*
<i>G. intraradices</i>	-	0,46 a**	0,68 a**	0,62 a**	0,46 a*
B) Micélio extrarradicular ativo (mg g⁻¹ de substrato)					
Controle	0,11 b**	0,05 b**	0,26 b**	0,06 b**	0,49 b**
<i>G. intraradices</i>	0,36 a**	0,19 a**	0,46 a**	0,39 a**	0,86 a**

Figura 27 A-B. Comprimento de micélio extrarradicular ativo para tangerina cléopatra, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 3 repetições.

hospedeira. É questionável também se o micélio extrarradicular medido é exclusivamente de FMA. Em sendo essa hipótese verdadeira, é necessário estabelecer qual a correlação que existe entre essa suposta massa micelial ativa e altura e/ou produção de massa seca e assimilação de CO_2 .

4.1.6 Transpiração e resistência estomática

Em termos de transpiração e resistência estomática, pode-se destacar dois pontos, 0 e 250 mg kg^{-1} de P de substrato (Figura 28 A-B), como sendo de importância chave para entender o sistema estudado e estabelecer correlação dessa variável, com as variáveis de resposta altura de plantas, produção de matéria seca da parte aérea e área foliar. Pode-se verificar que na condição limitante de P disponível no solo (0 mg kg^{-1} de P) (Figura 28 A)) o sistema micorrizado apresenta níveis mais reduzidos de transpiração e mais elevados de resistência estomática, quando comparados com o sistema não inoculado com FMA. A mesma tendência pode ser observada no extremo oposto, em dose alta de P (250 mg kg^{-1}) (Figura 28 B). É importante ressaltar, neste momento, que a colonização radicular interna, como visto, tende a decrescer com o aumento das doses de P, atingindo níveis bastante reduzidos na máxima dose de P.

Em dose baixa de P as plantas micorrizadas apresentaram, como visto, redução das taxas de transpiração e aumento da resistência estomática (Figura 28 A-B), apesar de, classicamente, plantas micorrizadas em baixo nível de fosfato tenderem a apresentar o contrário (Smith, 1988; Kothari et al., 1990). No entanto, redução de taxa de transpiração tem sido verificada (Drüge & Schönbeck, 1992). Estas reduções podem implicar em fechamento de estômatos ou restrição à difusão de gases, que inclui aqui O_2 e CO_2 . Como as plantas micorrizadas apresentam maiores altura e produção de massa seca, significa que para haver este ganho em termos de biomassa houve aumento nas taxas de fotossíntese, ou seja, aumento na assimilação do CO_2 , o que pode ser atribuído à presença beneficiadora do FMA no sistema por favorecer aumento na absorção de micro

Figura 28 A-B. Transpiração e resistência estomática para tangerina Cleópatra, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 4 repetições.

e macronutrientes, em especial de P, elemento chave na produção de fotoassimilados. Os possíveis aumentos nas taxas de fotossíntese podem ser respaldados pelo aumento marcante na área foliar das plantas micorrizadas. Assim, pode-se inferir que a energia que poderia ser perdida no processo respiratório está sendo canalizada para produção de carboidratos, em especial sacarose, produção de biomassa vegetal e, consequentemente, crescimento. Por outro lado, na condição de dose alta de P, a ocorrência de redução das taxas de transpiração, aumento da resistência estomática e tendência de redução na produção de biomassa vegetal e área foliar, podem ser explicadas, em parte, pela redução da colonização interna e existência de estruturas extrarradiculares do fungo ativas no sistema. Uma vez existindo micélio extrarradicular ativo no sistema micorrizado, pode-se estabelecer um dreno de carboidratos nas raízes do hospedeiro, que nesta condição não contará com os retornos por parte do fungo, que, por sua vez necessitaria para isso de estar completamente estabelecido no interior das células do hospedeiro. Esse dreno de sacarose não sendo compensado por aumentos em assimilação de CO₂ (aumento na resistência estomática e restrição a trocas gasosas), resulta em queda de produção de biomassa, no caso, altura e matéria seca. Deve-se estabelecer aqui que as reduções na colonização interna podem ser explicadas pelo alta concentração de P nas células das

raízes micorrizadas, em relação ao meio externo, o que demanda energia a ser despendida pelo hospedeiro para absorver o elemento (gradiente de potencial eletroquímico). Nessa condição, o hospedeiro passa a limitar a existência de estrutura interna do fungo, consideradas de alto custo energético de manutenção. O sistema, no entanto, ajusta-se à nova situação, num novo patamar. Ocorre, portanto, um ajuste da interação à condição estabelecida, regulada pelo hospedeiro, provavelmente pelo conteúdo de carboidrato, em especial sacarose e glicose. O sistema mantém-se ativo e não há parasitismo.

4.1.7. Fluorescência da clorofila a

Para testar a hipótese de relação entre depressão de crescimento e alteração da taxa fotossintética e de utilização de fotoassimilados, começou-se a estudar parâmetros ligados à captação da energia luminosa, que acontece a nível dos tilacóides, nos cloroplastos. Após estudar o transporte de elétrons o objetivo seguinte foi, num segundo passo, avaliar a assimilação do CO_2 e a síntese de produtos chaves da fotossíntese, como sacarose e amido.

Nas Figuras 29 (A-B) e 30 (A-D) são apresentados os valores de ϕ_P^{open} para o sistema estudado. Valores desse parâmetro em torno de 0,80 definem o limite de estresse e o destino da energia luminosa captada. Em caso de estresse os valores de ϕ_P^{open} , normalmente, são inferiores a 0,60. Nesse caso parte da energia captada é perdida por mecanismos como o da Fluorescência da Clorofila. Não havendo problemas, o fluxo ocorre normal e a energia captada será utilizada para formar poder redutor, NADPH, e ATP, usados na assimilação do CO_2 . Das Figuras pode-se verificar que a presença de fosfato e, principalmente, do Fungo Micorrizico Arbuscular (FMA), restabelecem a normalidade do sistema, eliminando o efeito de estresse, verificado no sistema com nível limitante de fosfato (considerado 0) e sem FMA. Em termos de eficiência de aproveitamento da energia luminosa incidente, o sistema com nível limitante de P, mas com FMA é comparável aos sistemas com doses de P consideradas altas. Resultados dessa natureza têm uma implicação prática muito grande, que diz respeito à economia de

adubo fosfatado e viabilização de sistemas agrícolas em condições de solos de baixa capacidade produtiva ou com limitações de fertilidade química, física ou biológica, condições essas facilmente encontradas em solos tropicais.

Tratamentos	P (mg kg ⁻¹)				
	0	200	400	600	800
A) Φ _P ^{open} - Folhas Novas - 91º Dia					
Controle	0,35 b**	0,74 a	0,70 a	0,68 a	0,66 a
<i>G. intraradices</i>	0,73 a**	0,70 a	0,72 a	0,71 a	0,73 a
B) Φ _P ^{open} - Folhas Velhas - 91º Dia					
Controle	0,28 b**	0,66 b*	0,66 a	0,70 a	0,70 a**
<i>G. intraradices</i>	0,58 a**	0,72 a*	0,68 a	0,65 a	0,60 b**

Figura 29 A-B. ϕ_P^{open} para tangerina Cleópatra, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 4 repetições.

Uma vez que no sistema que apresenta depressão de crescimento, o aproveitamento de energia luminosa e transporte de elétrons está ocorrendo de forma

Tratamentos	P (mg kg ⁻¹)				
	50	200	400	600	800
A) Taxa de fotossíntese (μmolO₂ m⁻² s⁻¹)					
Controle	7,95 a	14,02 a	17,53 a**	18,61 a**	19,33 a**
<i>G. intraradices</i>	9,86 a	14,91 a	14,60 b**	13,28 b**	14,97 b**
C) Taxa de fotossíntese (μmol O₂ m⁻² s⁻¹)					
Controle	-	5,23 a**	9,99 a**	10,48 a**	10,03 a**
<i>G. intraradices</i>	-	4,62 b**	6,45 b**	7,15 b**	7,79 b**

Figura 30 A-D. $\phi_{p\ open}$ para tangerina Cleópatra, no tempo, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 4 repetições.

normal, resta saber como está sendo aproveitada essa energia em termos de assimilação do CO_2 . Se há redução de biomassa e a captação e transporte da energia incidente estão ocorrendo de forma normal, é de se esperar que parte da energia que iria produzir crescimento esteja sendo desviada em algum ponto do sistema. Fica claro, portanto, a importância de se conhecer como está ocorrendo a assimilação do CO_2 .

4.1.8. Taxas de fotossíntese

As taxas de fotossíntese, medidas com eletrodo de O_2 (Figura 31 A-C), foram influenciadas pelas doses de P e fungo micorrízico arbuscular. O aumento da taxa de fotossíntese resultante da inoculação de tangerina cleópatra com FMA foi de 24 %, enquanto que as reduções resultantes do aumento das doses de P variaram de 12 a 35 %, com uma média de 25 % (Figura 31 A-C). Nesse porta-enxerto a redução da taxa de fotossíntese em presença de FMA ocorreu de forma significativa a partir de 200 mg de P kg^{-1} de substrato. Para o porta-enxerto limão cravo, os aumentos das taxas de fotossíntese resultante da inoculação com FMA até aproximadamente 350 mg kg^{-1} de P variaram de 85 a 117 % (Figura 32 A). A partir dessa dose verificou-se redução significativa na taxa de fotossíntese da ordem de 44 %.

Os aumentos de fotossíntese como resultado da inoculação com FMA são conhecidos e podem ser atribuídos à interação de uma série de fatores relacionados à planta hospedeira, ao fungo e às condições edafoclimáticas. No entanto, o aumento na absorção de nutrientes, na síntese de hormônios e na síntese de sacarose e amido exercem um papel relevante na regulação do mecanismo fotossintético em micorriza arbuscular. Para que haja redução das taxas de fotossíntese, algum ponto da via metabólica relacionada à produção de fotoassimilados pode estar sendo alterada. As diferentes vias metabólicas desde a assimilação do CO_2 , à síntese, por exemplo, de sacarose e amido, são altamente reguladas e delas participam uma série de enzimas de importância chave na regulação do sistema. Como o sistema FMA-planta hospedeira é determinantemente dependente da produção de energia do hospedeiro, no caso transportada como sacarose, torna-se de suma importância estudar e entender a produção e transporte desse açúcar,

Tratamentos	P (mg kg ⁻¹)				
	50	200	400	600	800
A) Taxa de fotossíntese (μmolO₂ m⁻² s⁻¹)					
Controle	7,95 a	14,02 a	17,53 a**	18,61 a**	19,33 a**
<i>G. intraradices</i>	9,86 a	14,91 a	14,60 b**	13,28 b**	14,97 b**
C) Taxa de fotossíntese (μmol O₂ m⁻² s⁻¹)					
Controle	-	5,23 a**	9,99 a**	10,48 a**	10,03 a**
<i>G. intraradices</i>	-	4,62 b**	6,45 b**	7,15 b**	7,79 b**

Figura 31 A-D. Taxas de fotossíntese e respiração no escuro (dark respiration) para tangerina Cleópatra e limão cravo, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 4 repetições.

bem como as enzimas e metabólitos relacionados à sua síntese. Pesquisas recentes indicam a importância que o “status” metabólico do hospedeiro tem em regular o metabolismo de carboidratos do fungo micorrízico arbuscular em espécies como citros (Shachar-Hill et al., 1995).

	P (mg kg ⁻¹)				
Tratamentos	25	50	150	250	500
A) Taxa de Fotossíntese (μmolO ₂ m ⁻² s ⁻¹)					
Controle	1,03 a	3,08 b**	7,25 b**	7,57 b**	17,38 a**
<i>G. intraradices</i>	2,24 a	5,71 a**	12,19 a**	11,11 a**	9,69 b**

Figura 32 A-B. Taxas de fotossíntese (liberação de O₂) e respiração no escuro (dark respiration) para limão cravo, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 4 repetições

Contrário ao observado para as taxas de fotossíntese, as doses de P e inoculação com FMA não influenciaram as taxas de respiração no escuro (Dark Respiration) (Figura 31 B-D e 32 B).

Analisando em conjunto os resultados dos experimentos até agora mencionados, pode-se observar que plantas colonizadas em altas doses de P, comparadas ao controle não inoculado, apresentaram, em média, reduções de 30 % em altura de plantas, 45 % em massa seca, 32 % em área foliar. Apresentaram também alta resistência estomática, com reduções na taxa de transpiração e de fotossíntese da ordem de 33 %. Considerando-se a demanda de FMA por carbono variando de 4 a 17 % (Peng et al., 1993), as reduções significativas da colonização radicular interna e os aumentos da quantidade de micélio extrarradicular ativo, os resultados obtidos parecem indicar que a depressão de crescimento em sistema colonizado com FMA não é devido unicamente à competição por carboidratos resultante de força de dreno estabelecido pelo fungo. Assim, outros fatores devem estar concorrendo para a redução dos parâmetros analisados, que podem estar relacionados aos mecanismos de regulação da síntese de sacarose e a um possível desbalanço hormonal resultante do aumento da disponibilidade de P no substrato e aumento da absorção do elemento pela planta hospedeira. Os mecanismos relacionados à síntese de sacarose serão apresentados e discutidos no próximo capítulo (experimento 6).

4.2. EXPERIMENTO 6

4.2.1. Altura de Plantas, Matéria Fresca da Parte Aérea, Relação Parte Aérea/Raiz e Assimilação do CO₂

As Figura 33 A-B e 34 A-D, são apresentadas com o objetivo de evidenciar, no sistema estudado, o que tem sido chamado de depressão de crescimento. Observando-se estas figuras percebe-se que a presença do fungo micorrízico arbuscular no sistema resulta em redução de crescimento tanto em altura, como em produção de massa fresca. Bem menos evidente é o efeito das doses de P, o que leva a crer que a inoculação com

fungo micorrízico arbuscular é mais relevante e determinante que o nível de fosfato usado. A inoculação com FMA resultou em reduções na altura de plantas da ordem de 17 a 32 % e na produção de massa fresca de 27 a 35 %. Redução em parâmetros como altura e produção de massa fresca ou seca pode estar relacionada diretamente a reduções nas taxas de assimilação de CO₂, ou seja nas taxas de fotossíntese, e, consequentemente, na produção de fotoassimilados, como discutido anteriormente. Em estudos de fisiologia vegetal esses parâmetros são usados muitas vezes para estimar taxas de fotossíntese. As reduções em altura e massa fresca não foram acompanhadas por reduções na assimilação de CO₂. Nas doses de P onde ocorreram as maiores reduções de altura e massa fresca, verificou-se aumento significativo nas taxas de fotossíntese. Era de se esperar que o aumento médio de 70 % na assimilação de CO₂ fosse suficiente para compensar um

Tratamentos	P (mg kg ⁻¹)			
	50	200	400	800
Altura (cm)				
Controle	8,50 b*	11,20 a**	10,63 a**	10,33 a*
<i>G. intraradices</i>	10,33 a*	7,57 b**	7,70 b**	8,63 b*
Matéria Fresca (g)				
Controle	0,82 b**	1,29 a**	1,07 a*	0,85 a*
<i>G. intraradices</i>	1,14 a**	0,84 b**	0,77 b*	0,62 b*

Figura 33 A-B. Altura e massa fresca da parte aérea para limão cravo, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 3 repetições.

possível efeito de dreno estabelecido pela presença do FMA. No geral, observou-se a correlação negativa entre produção de massa fresca e altura de plantas e assimilação do CO₂.

Tratamentos	P (mg kg ⁻¹ de substrato)			
	50	200	400	800
A) Assimilação de CO₂ por folhas novas (μmol g⁻¹ s⁻¹)				
Controle	0,056 a	0,020 b*	0,023 b*	0,037 a*
<i>G. intraradices</i>	0,048 a	0,036 a*	0,037 a*	0,024 b*
C) Assimilação de CO₂ por folhas velhas (μmol g⁻¹ s⁻¹)				
Controle	0,057 a	0,048 a	0,046 a	0,051 a
<i>G. intraradices</i>	0,055 a	0,044 a	0,049 a	0,046 a

Figura 34 A-D. Taxa de fotossíntese (assimilação de CO₂) e respiração no escuro (dark respiration) para limão cravo, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 3 repetições.

Um efeito significativo na redução da taxa de fotossíntese só foi observada na dose mais alta de P (800 mg kg⁻¹). A redução de 60 % foi muito mais significativa do que as reduções observadas nos parâmetros altura e massa fresca.

Como pode ser visto nas figuras mencionadas, as reduções em altura e massa fresca tornam-se evidentes em dose de P superior a 200 mg kg⁻¹. Além das reduções em altura e massa fresca, há também a tendência de redução na produção de massa fresca de raízes, concorrendo para a redução da relação parte aérea/raíz no sistema micorrizado.

4.2.2. Glicose, frutose e sacarose nas folhas e raízes

Nas Figuras 35 e 36 A-B são apresentadas as concentrações de hexoses nas folhas e raízes, determinadas por método enzimático. Destacam-se aqui os níveis baixos de glicose no sistema micorrizado nas maiores doses de P (Figura 35). Nas raízes a presença de glicose não pode ser detectada pelo método usado (Figura não apresentada). É importante destacar também a inexistência de diferença nas concentrações de sacarose nas folhas entre os tratamentos estudados, mas observa-se um aumento significativo nas

Tratamentos	P (mg kg ⁻¹ de substrato)			
	50	200	400	800
	Glicose nas folhas (µmol mg ⁻¹ MS)			
Controle	25,16 a**	25,90 a	17,85 a**	22,33 a**
G. intraradices	19,32 b**	24,06 a	13,09 b**	0,00 b**

Figura 35. Concentrações de glicose nas folhas e raízes de limão cravo, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 3 repetições.

raízes micorrizadas a partir de 400 mg kg⁻¹. Quanto às concentrações de glicose, observa-se redução drástica desse açúcar em plantas inoculadas com o aumento das doses de P. Comparadas ao controle não micorrizado, as concentrações baixas de glicose nas folhas de plantas micorrizadas, podem estar relacionadas a utilização pelo sistema, uma vez que a glicose apresenta um papel chave e central na regulação da interação fungo-hospedeiro (Shachar-Hill et al., 1995). Por outro lado, as concentrações de frutose nas folhas de plantas micorrizadas tenderam a ser superiores às encontradas em plantas não micorrizadas na faixa de 100 a 600 mg kg⁻¹ de P (figura 36 A-B). Nas raízes, as

Tratamentos	P (mg kg ⁻¹ de substrato)			
	50	200	400	800
A) Frutose nas folhas (µmol mg⁻¹ MS)				
Controle	13,40 a	13,85 b**	8,71 a	12,32 a
<i>G. intraradices</i>	9,59 a	23,74 a**	11,81 a	11,86 a
B) Frutose nas raízes (µmol mg⁻¹ MS)				
Controle	11,29 a	12,43 a	1,86 a	13,27 a**
<i>G. intraradices</i>	13,27 a	12,76 a	2,00 a	0,00 b**

Figura 36 A-B. Concentrações de frutose nas folhas e raízes de limão cravo, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 3 repetições.

concentrações de frutose em plantas micorrizadas são menores, comparadas as concentrações encontradas nas folhas, e tendem a limites não detectáveis em doses altas de P (Figura 36 B).

Em termos de sacarose era de se esperar uma maior concentração desse açúcar nas folhas de plantas micorrizadas, a priori, que poderia suportar um possível dreno de carboidratos resultante da presença de FMA (Figura 37 A-B). No entanto, isto pode significar que grande parte da sacarose produzida está sendo transportada para atender à demanda do sistema em crescimento ou da “simbiose”.

No geral, observou-se maiores concentrações de glicose, frutose e sacarose em folhas de plantas micorrizadas, comparado ao controle não inoculado. As concentrações desses carboidratos nas raízes de plantas micorrizadas foram menores comparadas às concentrações encontradas em plantas não micorrizadas. As reduções das concentrações de açucares em raízes de plantas micorrizadas podem estar associadas a aumentos na exsudação desses fotoassimiladores pela raiz. Como a colonização radicular interna foi extremamente baixa (traços) e considerando-se que a redução de açucares nas raízes de plantas micorrizadas é atribuída à exsudação radicular, chega-se à conclusão que a hipótese que atribui a redução de colonização em alto P como devida à redução na

Figura 37 A-B. Concentrações de sacarose nas folhas e raízes de limão cravo, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 3 repetições.

exudação de carboidratos não é verdadeira para o caso em questão, onde provavelmente deva ter ocorrido aumento de exsudatos com o aumento das doses de P. Para se estabelecer conclusões acerca do destino dos carboidratos no sistema micorrizado, torna-se importante conhecer as concentrações de amido no sistema e as atividades enzimáticas a ele relacionadas.

4.2.3. Amido nas folhas e raízes

Há tendência de aumento da concentração de amido tanto nas folhas, como nas raízes de plantas micorrizadas, especialmente nas raízes em doses mais altas de P (Figura 38 A-B). Isto pode significar que parte das hexoses disponíveis no sistema estão sendo desviadas para formar amido, no cloroplasto, em detrimento da síntese de sacarose, no citosol. A tendência de aumento de concentração de amido é coerente com a tendência de redução das taxas de fotossíntese observadas no sistema micorrizado. O fato de haver maior superávit de amido em raízes de plantas micorrizadas do que em folhas também vem a corroborar a idéia de que a maior parte dos fotoassimilados está sendo drenada para as raízes (ou seja, o FMA).

4.2.4. Fósforo Inorgânico (Pi) nas folhas e raízes

Não foi observada diferença significativa na concentração de Pi nas folhas (Figura 39 A-B) de limão cravo entre os tratamentos estudados. Era de se esperar aumento da concentração foliar, uma vez que houve aumento na disponibilidade de P no substrato (figura 40). A absorção de P com o aumento do P disponível no substrato, principalmente nas plantas micorrizadas, tem sido frequentemente observada e, em baixo nível de P, é um dos benefícios do fungo à planta hospedeira. No entanto, tem sido observado que, dependendo do genótipo de citros e do grau de dependência micorrízica, em altas doses

Tratamentos	P (mg kg ⁻¹ de substrato)			
	50	200	400	800
A) Amido nas folhas (mmol mg⁻¹ MS)				
Controle	183,44 b*	268,30 a	291,71 b**	226,69 a
<i>G. intraradices</i>	241,92 a*	218,76 a	395,65 a**	261,62 a
B) Amido nas raízes (µmol mg⁻¹ MS)				
Controle	289,77 a	504,51 a**	471,48 b*	280,24 b**
<i>G. intraradices</i>	374,88 a	329,31 b**	631,47 a*	584,76 a**

Figura 38 A-B. Concentrações de amido nas folhas e raízes de limão cravo, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 3 repetições.

de P pode-se não encontrar diferenças nas concentrações foliares de P, entre plantas micorrizadas e não micorrizadas (Graham et al., 1997). Por outro lado, a tendência de acúmulo de Pi nas raízes (Figura 16) pode assumir um papel determinante na interação com outros nutrientes, principalmente metais, e exercer limitações em termos fisiológicos, bioquímicos e de crescimento de plantas. Esse acúmulo de fosfato, provavelmente na forma de polifosfatos, parece não mediar a regulação do metabolismo do hospedeiro, mesmo quando as plantas micorrizadas absorvem mais fosfato (Sachar-Hill et a., 1997). O aumento observado na disponibilidade de P do substrato onde cultivou-se plantas micorrizadas é realmente de grande importância prática para o manejo de culturas micorrizadas e pode estar associado à interação de micorriza com organofosfatos do

solo, favorecendo a sua mineralização por hidrólise enzimática (Jayachandran et al., 1990; Marschner, 1995). Em solos calcários, com precipitações de p como fosfato de cálcio, o aumento da produção de CO₂ resultante do aumento da respiração de raízes micorrizadas pode contribuir para aumentar a solubilidade desses fosfatos no solo e favorecer a nutrição do hospedeiro em P. O aumento do Pi em raízes de plantas micorrizadas variou de 40 a 89 %, em função das doses de P e foi mais alto nos níveis mais altos do elemento.

Tratamento	P (mg kg ⁻¹ de substrato)			
	50	200	400	800
A) Fósforo inorgânico nas folhas (µmol mg⁻¹ MS)				
Controle	32,57 a	49,70 a	30,42 a	37,22 a
<i>G. intraradices</i>	36,80 a	45,58 a	26,43 a	36,28 a
B) Fósforo inorgânico nas raízes (µmol mg⁻¹ MS)				
Controle	26,99 a	32,39 a	37,52 b*	37,69 b**
<i>G. intraradices</i>	23,84 a	28,53 a	52,37 a*	71,33 a**

Figura 39 A-B. Concentrações de fósforo inorgânico em folhas e raízes de limão cravo, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 3 repetições.

Tratamentos	P (mg kg ⁻¹)			
	50	200	400	800
P disponível no substrato (mg dm ⁻³)				
Controle	32,33 a	45,33 a	88,33 a	144,67 b**
<i>G. intraradices</i>	35,00 a	53,67 a	99,00 a	236,67 a**

Figura 40. Disponibilidade de P em substrato cultivado com limão cravo, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 3 repetições.

4.2.5. Sacarose Sintase e Invertase nas raízes

Sacarose sintase é responsável pela quebra da molécula de sacarose em frutose e UDPGlicose, atuando no citosol onde a sacarose é formada. A atividade dessa enzima em raízes de citros micorrizados foi inferior à atividade observada no controle, não micorrizado. Em ambos os sistemas, as doses de P não exerceram influência significativa na atividade da enzima, principalmente em doses superiores a 200 mg kg⁻¹ (Figura 41). A atividade da invertase seguiu a mesma tendência (Figura 42 A-C). No entanto, as concentrações de sacarose sintase foram aproximadamente 2 vezes maiores, quando comparadas com as concentrações de Invertase. Isto define sacarose sintase como a enzima sacarolítica de maior importância em tecidos radiculares de citros. Esses

resultados contrariam os obtidos na literatura, principalmente em se tratando de raízes micorrizadas onde se espera uma atividade mais intensa dessas enzimas, especialmente de invertase (ácida ou alcalina), responsável pela quebra da molécula de sacarose, pela via apoplástica, em glicose e frutose. Esta menor atividade das enzimas sacarolíticas em tecido radicular pode significar uma baixa demanda de carbono, ou seja de glicose, pelo sistema. Estes resultados são coerentes com os resultados de colonização radicular, onde apenas traços de colonização foram verificados, inclusive no nível mais baixo de P (200 mg kg⁻¹). Isto deveu-se provavelmente ao tipo de substrato usado, com P disponível inicialmente já alto e, por ser arenoso e orgânico, favorecendo o aumento do P disponível (figura 40); outra razão pode ter sido o reduzido desenvolvimento das plantas, bem inferior aquele observado em casa-de-vegetação no Brasil. A baixa atividade de enzimas

Tratamentos	P (mg kg ⁻¹ de substrato)			
	50	200	400	800
Sacarose sintase nas raízes (nkatal g ⁻¹ MS)				
Controle	50,34 a**	63,96 a**	71,61 a**	67,08 a**
G. intraradices	46,76 b**	38,55 b**	56,27 b**	48,69 b**

Figura 41 . Concentrações de sacarose sintase (SuSy) em raízes de limão cravo, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 3 repetições.

sacarolíticas em raízes de porta-enxerto cítrico micorrizado com FMA pode ser explicada pela baixa concentração de hexoses nas raízes que, através de um mecanismo simporte de hexose, regularia a síntese de invertase ligada à parede celular em tecidos de região de dreno de carboidrato (Zamski & Barnea, 1991; Schaeffer et al., 1995; Hampp et al., 1995; Koch et al., 1996; Lee & Sturm, 1996; Roitsch & Tanner, 1996).

Na Figura 43 (A-B) são apresentados os resultados de atividade de invertase em função do pH. Na faixa de pH de 3,4 a 5,0 (ácido), foi verificada a existência de atividade da enzima, o que não ocorreu no controle não micorrizado. Provavelmente, deva tratar-se de uma izoenzima (Saulzer & Hager, 1993; Takahata et al., 1996), atuando de forma específica em tecido radicular das plantas inoculadas por FMA. A enzima estaria ligada à parede celular da célula do hospedeiro e a sua síntese seria regulada pela concentração de hexoses (Hampp et al., 1995; Roitsch & Tanner, 1996).

Logo, o aumento de atividade de invertase ácida em raiz colonizada por FMA, pode estar associada à atividade de dreno e hidrólise de sacarose, produzindo hexoses, que induzam a síntese da enzima na região apoplástica (Hampp et al., 1995).

Outros aspectos interessantes, observados na análise de invertase, foram os efeitos de NaCl 0,5 M em aumentar a atividade de frações da enzima ligadas à parede celular (Figura 42 B-C) e a ocorrência de atividade em pH extremamente ácido (figura 42 A e 43 A-B). A ocorrência de atividade enzimática nessa faixa de pH é difícil de interpretar, uma vez que o pH mencionado encontra-se bem abaixo do pH fisiológico que favorece a atividade de enzimas. Outro agravante é o fato de que na faixa de pH onde realizou-se a análise de invertase, a hidrólise de sacarose ocorre predominantemente pela via química. Nessa faixa de pH podem ocorrer também precipitações de substâncias (por exemplo proteínas), que podem ter concorrido para alterar o resultado da análise. Apesar dessas observações, investigações no sentido de se verificar as razões de atividade de invertase nessa faixa extremamente baixa de pH devem ser consideradas.

Tratamentos	P (mg kg ⁻¹ de substrato)			
	50	200	400	800
A) Invertase nas raízes (nkatal g⁻¹ MS)				
Controle	26,58 a**	22,68 a**	28,13 a**	21,82 a**
<i>G. intraradices</i>	14,42 b**	8,99 b**	9,36 b**	13,80 b**
B) Invertase nas Raízes (nkatal g⁻¹ MS)				
Controle	7,02 a	6,17 a	6,13 a	11,75 a**
<i>G. intraradices</i>	7,21 a	8,25 a	6,35 a	4,24 b**
C) Invertase nas raízes (nkatal g⁻¹ MS)				
Controle	25,60 a**	25,53 a**	23,56 a**	25,13 a**
<i>G. intraradices</i>	7,29 b**	3,39 b**	1,16 b**	6,71 b**

Figura 42 A-C. Concentrações de invertase em raízes de limão cravo, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 3 repetições.

Portanto, embora uma grande quantidade de sacarose esteja sendo drenada das folhas para as raízes, apenas uma pequena parte dessa está sendo desdobrada (talvez para fornecimento ao FMA) e a maior parte está sendo convertida para amido.

Figura 43 A-B. Atividade de invertase em raízes de limão cravo, em função da inoculação ou não com FMA e pH. Média de 3 repetições.

4.2.6. Sacarose Sintase nas folhas

As atividades de Sacarose Sintase (SuSy) em folhas de citros micorrizados apresentaram a mesma tendência da atividade nas raízes, ou seja atividade mais baixa, quando comparada ao controle, sem fungo micorrízico (Figura 44). No entanto, esse resultado era esperado, uma vez que foi encontrada atividade alta de SPS em folhas de citros micorrizado. Normalmente a atividade alta de SPS está relacionada à atividade baixa de Susy. (Zamski & Barnea, 1996; Hampp et al., 1995; Schaeffer et al., 1987).

Tratamento	P (mg kg ⁻¹ de substrato)			
	50	200	400	800
	Sacarose Sintase nas folhas (nkatal g ⁻¹ MS)			
Controle	28,17 a**	30,17 a**	30,05 a**	31,15 a**
<i>G. intraradices</i>	20,21 b**	18,99 b**	22,01 b**	20,06 b**

Figura 44. Atividade de sacarose sintase em folhas de limão cravo, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 3 repetições.

4.2.7. Sacarose Fosfato Sintase (SPS)

Sacarose fosfato sintase (SPS) é a enzima chave responsável pela síntese de sacarose em plantas e possui como substrato Frutose e UDPGlicose. Plantas micorrizadas apresentaram alta atividade dessa enzima, quando comparado ao controle não micorrizado (Figura 45 A-B). Alta atividade de SPS significa alta síntese de sacarose (Hampp et al., 1995; Loewe et al., 1996; Huber & Huber, 1996). Sendo assim, as concentrações de sacarose deveriam ter sido superiores nas folhas de plantas micorrizadas, o que não ocorreu (Figura 37 A). Isto pode significar que a sacarose produzida foi transportada via floema para regiões das plantas consideradas como dreno, como as raízes, onde pode então ser alvo das enzimas sacarolíticas, no caso Invertase, atuando na via apoplástica, ou entrar nas células das raízes, e sob a mediação de sacarose sintase, formar amido. Um resultado realmente importante é o fato da presença de fungo

micorrízico arbuscular aumentar marcadamente a atividade de SPS e síntese de sacarose em tecidos foliares de citros. Essa mesma tendência foi verificada usando-se tecidos foliares de Tangerina Cleópatra cultivada no Brasil (Figura 45 B).

Tratamentos	P (mg kg ⁻¹ de substrato)			
	50	200	400	800
A) Sacarose Fosfato Sintase (nkatal g⁻¹ MS)				
Controle	19,35 b**	24,94 b**	15,02 b**	32,04 b**
<i>G. intraradices</i>	44,90 a**	35,69 a**	37,57 a**	45,43 a**
B) Sacarose Fosfato Sintase B (nkatal g⁻¹ MS)				
Controle	41,70 a	26,07 b**	24,51 a	31,68 b*
<i>G. intraradices</i>	36,93 a	33,72 a**	29,39 a	37,59 a*

Figura 45 A-B. Concentrações de sacarose fosfato sintase (SPS) em folhas de limão cravo, em função da inoculação ou não com FMA e doses de P. Média de 3 repetições.

4.2.8. Grau de Ativação de SPS

A presença de fosfato inorgânico em concentração elevada pode reduzir o grau de ativação de SPS. Considerando este fato e de posse dos resultados referentes à concentração de sacarose em tecido foliar (figura 37 A) e a atividade de SPS, decidiu-se

verificar, usando amostras na dose mais alta de P (800 mg kg^{-1}), o estado de ativação de SPS em tecido foliar de plantas micorrizadas e não micorrizadas. Pela Figura 46 A-B, pode-se verificar o ótimo de atividade de SPS quando do uso de 2 mM de Frutose-6-P (Fru-6-P) e 20 mM de Glicose-6-P (Glic-6-P). De posse dessas curvas foram calculados os parâmetros cinéticos, K_m e $V_{\text{máx}}$ para Fru-6-P, substrato da enzima, em presença do ativador alostérico Glic-6-P, que são apresentados na Tabela 3. Comparando-se as amostras de tecido não micorrizado com material micorrizado verifica-se que o grau de ativação de SPS é maior em presença de fungo micorrízico arbuscular, o que justifica as altas atividades de SPS e síntese de sacarose nessa condição, mesmo em alta dose de P. Na ausência de ativador alostérico, o K_m de tecido micorrizado foi reduzido em 80 %, o que significa um aumento considerável no grau de ativação de SPS.

Figura 46 A-B . Atividades de sacarose fosfato sintase (SPS) (folhas), em função de níveis de frutose-6-P e glicose-6-P. Média de 3 repetições.

A Figura 47 procura sintetizar os resultados discutidos acima. Ocorrendo captação de energia luminosa, nos cloroplastos, haverá formação de ATP e NADPH e Trioses-P, que são trocadas por Pi, vindo do citosol. Nesse momento poderá haver síntese de sacarose, mais freqüente, ou de amido. A sacarose sintetizada no citosol é

Tabela 3. Km e Vmax para Fru-6-P em presença de diferentes concentrações do ativador alostérico Gluc-6-P, usando amostras de tecido foliar de citros com e sem fungo micorrízico arbuscular e 800 mg kg⁻¹ de P. Média de 3 repetições.

Gluc-6-P (mM)	Controle		<i>G. intraradices</i>	
	Km	Vmax	Km	Vmax
0	0,601	3,77	0,120	18,06
1	0,483	5,49	0,123	20,04
2	0,409	7,47	0,099	20,44
3	0,407	11,25	0,096	21,23
5	0,356	13,83	0,123	22,69
20	0,213	16,18	0,126	25,16

então exportada via floema até as raízes, onde pode sofrer ação de enzimas sacarolíticas pela via apoplástica, no caso Invertase, gerando glicose e frutose que serão utilizados pelo hospedeiro ou pelo fungo. Outro destino é entrar na célula da raiz e ser clivada por sacarose sintase e, por fim, formar amido. No caso em questão, no sistema micorrizado, a sacarose produzida pela alta atividade da SPS é exportada via floema e parte sendo aproveitada pelos simbiossiontes como glicose e frutose. Outra parte está sendo desviada para formação de amido no interior das células da raiz do hospedeiro. A hipótese de alteração das taxas de fotossíntese e de utilização de fotossintato para explicar a depressão de crescimento pode ser aceitável e a existência de dreno de carbono como resultante da presença no sistema de estruturas do fungo não é totalmente consistente com os resultados observados. O fato de existir micélio ativo no sistema, mesmo em condições consideradas extremamente baixas de colonização interna (consideradas como 0) não é satisfatória por si só para justificar as reduções em altura e produção de massa seca em porta-enxerto cítrico, uma vez que a exportação de fotoassimilados para as raízes micorrizadas parece ser muito mais abundante do que o demandado pelo fungo. Além disso, as limitações do método de determinação de micélio ativo podem não ser base muito sólida para se atribuir a depressão de crescimento como sendo devida à

presença de massa micelial extrarradicular. Para se estabelecer com clareza qual a relação existente entre micélio extrarradicular ativo, dreno de carboidratos e redução de crescimento em condições doses altas de P, é necessário responder a questões básicas como: Quanto da quantidade de micélio ativo medido pertence realmente a FMA; qual a correlação que existe entre a massa de micélio externo e altura, produção de biomassa e fotossíntese. No presente experimento foi encontrada correlação entre micélio extrarradicular ativo e variáveis como altura e produção de massa seca. No entanto, o mesmo não foi conseguido por Gomes (1997). A resposta parece depender do hospedeiro, da espécie de FMA e de condições ambientais.

Os resultados permitem também estabelecer outra hipótese complementar para explicar a depressão de crescimento em porta-enxertos cítricos. Nessa hipótese a ocorrência de depressão estaria relacionada a desbalanço nutricional, resultante da interação de P com metais nas raízes micorrizadas, que por sua vez provocaria desbalanço hormonal e alteração da síntese de carboidratos. O resultado seria restrição ao crescimento do hospedeiro, que regularia a presença de FMA principalmente a nível intrarradicular. A consequência, no cômputo geral, seria o ajuste da simbiose à nova situação. Essa proposta é apresentada com mais detalhes na Figura 48.

De acordo como a Figura 48 acima, o sistema micorrízico, em condições de alto nível de P no substrato, absorve mais fósforo que termina por interagir com metais como Fe, Mn e Zn. Como resultado da interação, haveria desbalanço hormonal (relação auxina/citocinina/ácido abscísico) que afetaria área foliar e/ou assimilação de CO₂, resultando em redução de crescimento, que por sua vez levaria à redução de área foliar e assimilação de CO₂, estabelecendo um novo patamar de produção de fotoassimilados e de interação com o FMA. A alteração do balanço hormonal afetaria crescimento e produção de biomassa por reduzir a alongamento celular, a dominância apical, favorecendo encurtamento de internódios, emissão de ramos ladrões, redução de área foliar, redução de assimilação de CO₂ e de produção de biomassa vegetal.

No presente estudo, parece que a redução da assimilação do CO_2 terminou por induzir aumento da síntese de sacarose a partir da ativação de SPS. O aumento da disponibilidade de carboidratos ativaria genes relacionados com reserva e utilização de fotoassimilados em regiões de dreno. Por outro lado, nessas regiões, a produção de hexoses poderia, através da indução de genes repressores de fotossíntese, reduzir e manter reguladas as taxas de fotossíntese do hospedeiro.

É importante ressaltar que a inibição na absorção de certos metais como resultante do aumento da dose de fosfato é não competitiva e, portanto, não corrigida por adições de nutrientes via solo. A seleção de espécies e as aplicações de hormônio e dos nutrientes limitantes pode vir a minimizar ou eliminar o problema.

5. CONCLUSÕES

1. As alterações da taxa fotossintética e de utilização de fotoassimilados explica a depressão de crescimento no modelo usado;
2. A presença de fungo micorrízico arbuscular aumenta a síntese de sacarose, por aumentar a atividade de SPS;
3. Plantas micorrizadas apresentam maior estado de ativação de SPS;
4. A depressão de crescimento observada em plantas micorrizadas em condições de dose alta de P (maior que 200 mg kg⁻¹) pode estar relacionada diretamente a um aumento na exportação de sacarose para as raízes (dreno).
5. Acúmulo de P nas raízes de porta-enxertos micorrizados com FMA pode alterar mecanismos fisiológicos e bioquímicos, e afetar o crescimento e produção da planta hospedeira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D.; BOER, G. The effect of phosphorus on the formation of hyphae in soil by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus fasciculatum*. **New Phytologist**, v.97, n.3, p.437-446, 1984.
- ALLEN, M.F.; MOORE JR., T.S.; CHRISTENSEN, M. Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae: I. Cytokinin increases in the host plant. **Canadian Journal of Botany**, v.58, n.3, p.371-374, 1980.
- ALLEN, M.F.; SMITH, W.K.; MOORE JR., T.S.; CHRISTENSEN, M. Comparative water relations and photosynthesis of mycorrhizal and non-mycorrhizal *Bouteloua gracilis* H.B.K. Lag Ex Steud. **New Phytologist**, v.88, n.4, p.683-693, 1981.
- AMIJEE, F.; STRIBLEY, D.P.; TINKER, P.B. Soluble carbohydrates in roots of leek (*Allium porrum*) plants in relation to phosphorus supply and VA mycorrhizas. **Plant and Soil**, v.124, p.195-198, 1990.
- AMIJEE, F.; STRIBLEY, D.P.; TINKER, P.B. The development of endomycorrhizal root systems. **New Phytologist**, v.123, n.2, p.297-306, 1993.
- ANTUNES, V.; CARDOSO, E.J.B.N. Growth and nutrient status of citrus plants as influenced by mycorrhiza and phosphorus application. **Plant and Soil**, v.131, n.1,

p.11-19, 1991.

ARAI, M.; MORI, H.; IMASEKI, H. Roles of sucrose-metabolizing enzymes in growth of seedlings: purification of acid invertase from growing hypocotyls of mung bean seedlings. **Plant Cell Physiology**, v.32, n.8, p.1291-1298, 1991.

ARAUS, J.L.; AMARO, T.; VOLTAS, J.; NAKKOUL, H.; NACHIT, M.M. Chlorophyll fluorescence as a selection criterion for grain yield in durum wheat under Mediterranean conditions. **Field Crops Research**, v.55, n.3, p.209-223, 1998.

AZCÓN, R.; OCAMPO, J.A. Factors affecting the vesicular-arbuscular infection and mycorrhizal dependency of thirteen wheat cultivars. **New Phytologist**, v.87, n.4, p.677-685, 1981.

AZCÓN-AGUILAR, C.; BAGO, B. Physiological characteristics of the host plant promoting an undisturbed functioning of the mycorrhizal symbiosis. In: GIANINAZZI, S.; SCHÜEPP, H.(Eds.) **Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems**. Basel: Birkhäuser Verlag, 1994. p.47-60.

BAAS, R.; LAMBERS, H. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and phosphate on *Plantago major* ssp. *pleiosperma* in relation to the internal phosphate concentration. **Physiologia Plantarum**, v. 74, p.701-707, 1988.

BAREA, J.M. Vesicular-arbuscular mycorrhizae as modifiers of soil fertility. In: STEWART, B.A. (Ed). **Advances in soil science**. New York: Springer-Verlag, 1991. v.15, p.1-39.

BARROSO, J.; NEVES, H.C.; PAIS, M.S. Production of indole-3-ethanol and indole-3-

- acetic acid by the mycorrhizal fungus of *Ophrys lutea* (Orchidaceae). **New Phytologist**, v.103, p.745-749, 1986.
- BATTISTELLI, A.; ADCOCK, M.D.; LEEGOOD, R.C. The relationship between the activation state of sucrose-phosphate synthase and the rate of CO₂ assimilation in spinach leaves. **Planta**, v.183, n.4, p.620-622, 1991.
- BÉCARD, G.; DONER, L.W.; ROLIN, D.B.; DOUDS, D.D. Identification and quantification of trehalose in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi by *in vivo* ¹³C NMR and HPLC analyses. **New Phytologist**, v.118, p.547-552, 1991.
- BETHLENFALVAY, G.J.; PACOVSKY, R.S.; BROWN, M.S. Measurement of mycorrhizal infection in soybeans. **Soil Science Society of America Journal**, vol.45, p.871-875, 1981.
- BEVEGE, D.I.; BOWEN, G.D.; SKINNER, M.F. Comparative carbohydrate physiology of ecto- and endomycorrhizas. In: SANDERS, F.E.; MOSSE, B.; TINKER, P.B. (Eds.). **Endomycorrhizas**. Condon: Academic Press, 1975. p.77-86.
- BILGER, W.; SCHREIBER, U. Chlorophyll luminescence as an indicator of stress-induced damage to the photosynthetic apparatus. Effects of heat-stress in isolated chloroplasts. **Photosynthesis Research**, v.25, 161-171, 1990.
- BJORKMAN, O.; DEMMIG, B. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origin. **Planta**, n.170, p.489-504, 1987.
- BLOOM, A.J.; CHAPIN, F.S.III; MOONEY, H.A. Resource limitation in plants an economic analogy. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.16, p.363-392,

1985.

BRUNEAU, J.M.; WORRELL, A.C.; CAMBOU, B.; LANDO, D.; VOELKER, T.A.
 Sucrose phosphate synthase, a key enzyme for sucrose biosynthesis in plants. **Plant Physiology**, v.96, n.2, p.473-478, 1991.

BUWALDA, J.G.; GOH, K.M. Host-fungus competition for carbon as a cause of growth depression in vesicular-arbuscular mycorrhizal ryegrass. **Soil Biology and Biochemistry**, v.14, p.103-106, 1982.

CAEMMERER, S. von; FARQUHAR, G. D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta*, Berlin, v.153, p.376-387, 1981.

CARDOSO FILHO, J.A. Quantificação do micélio extramatricial de *Glomus etunicatum* e da atividade em simbiose com milho. Piracicaba, 1994. 119 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

CHIN, C.K.; WESTON, G.D. The relationship between invertase activity and growth in excised *Lycopersicon esculentum* roots. **Plant Science Letters**, v.4, n.1, p.25-30, 1975.

CLAUSSEN, W.; LOVEYS, B.R.; HAWKER, J.S. Influence of sucrose and hormones on the activity of sucrose synthase and invertase in detached leaves and leaf sections of eggplants (*Solanum melongena*). **Journal of Plant Physiology**, v.124, p.345-357, 1986.

COOPER, K.M. Growth responses to the formation of endotrophic mycorrhizas in *Solanum*, *Leptospermum*, and New Zealand ferns. In: SANDERS, F.E.; MOSSE,

- B.; TINKER, P.B. (Eds). **Endomycorrhizas**. London: Academic Press, 1975. p.391-407.
- COX, G.; TINKER, P.B. Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. I. The arbuscule and phosphorus transfer: a quantitative ultrastructural study. **New Phytologist**, v.77, p.371-378, 1976.
- COX, G.; SANDERS, F.E.; TINKER, P.B.; WILD, J.A. Ultrastructural evidence relating to host-endophyte transfer in a vesicular-arbuscular mycorrhiza. In: SANDERS, F.E.; MOSSE, B.; TINKER, P.B. (Eds). **Endomycorrhizas**. London: Academic Press, 1975. p.297-312.
- CSEKE, C.; BALOGH, A.; WONG, J.H.; BUCHANAN, B.B.; STITT, M.; HERZOG, B.; HELDT, H.W. Fructose 2,6-bisphosphate: a regulator of carbon processing in leaves. **Trends in Biochemical Sciences**, v.9, p.533-535, 1984.
- DANNEBERG, G.; LATUS, C.; ZIMMER, W.; HUNDESHAGEN, B.; SCHNEIDER-POETSCH, H.; BOTHE, H. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on phytohormone balances in maize (*Zea mays* L.). **Journal of Plant Physiology**, v.141, p.33-39, 1992.
- DICKINSON, C.D.; ALTABELLA, T.; CHRISPEELS, M.J. Slow-growth phenotype of transgenic tomato expressing apoplastic invertase. **Plant Physiology**, v.95, n.2, p.420-425, 1991.
- DOEHLERT, D.C.; HUBER, S.C. Regulation of spinach leaf sucrose phosphate synthase by glucose-6-phosphate, inorganic phosphate, and pH. **Plant Physiology**, v.73, n.3, p.989-994, 1983.
- DRÜGE, U.; SCHÖBECK, F. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection on

- transpiration, photosynthesis and growth of flax (*Linum usitatissimum* L.) in relation to cytokinin levels. **Journal of Plant Physiology**, v.141, p.40-48, 1992.
- ECHEVERRIA, E.; GONZALEZ, P. C.; BRUNE, A. Characterization of proton and sugar transport at the tonoplast of sweet lime (*Citrus limettioides*) juice cells. **Physiologia Plantarum**, v. 101, p.291-300, 1997.
- ECHEVERRIA, E.; SALVUCCI, M. E. Sucrose phosphate is not transported into vacuoles or tonoplast vesicles from red beet (*Beta vulgaris*) hypocotyl. **Plant Physiology**, v.96, p.1014-1017, 1991.
- ECHEVERRIA, E. Developmental transition from enzymatic to acid hydrolysis of sucrose in acid limes (*Citrus aurantifolia*). **Plant Physiology**, v.92, p.168-171, 1990.
- ECHEVERRIA, E. Activities of sucrose metabolising enzymes during sucrose accumulation in developing acid limes. **Plant Science**, v.85, p.125-129, 1992.
- ECHEVERRIA, E.; BURNS, J.; FELLE, H. Compartmentation and cellular conditions controlling sucrose breakdown in mature acid lime fruits. **Phytochemistry**, v.31, n.12, p.4091-4095, 1992.
- EGGER, B. Saccharose – Stoffwechsel in Fichtennadeln (*Picea abies* (L.) Karst) in Abhängigkeit von der Entwicklung, von Luftschadstoffen, Trockenstreß und Magnesiummangel. Tübingen (Alemanha), 1993, p.1-27. Tese (Doutorado). – Fakultät für biologie der Eberhard – Karis – Universität Tübingen.
- EGGER, B.; EINIG, W.; SCHLERETH, A.; WALLEND, T.; MAGEL, E.; LOEWE, A.; HAMPP, R. Carbohydrate metabolism in one-and two-year-old spruce needles, and stem carbohydrate from three months before until three months after bud break.

Physiologia Plantarum, v.96, p.91-100, 1996.

EGGER, B.; HAMPP, R. Invertase, sucrose synthase and sucrose phosphate synthase in lyophilized spruce needles; microplate reader assays. **Trees**, v.7, p.98-103, 1993.

EVERT, R.F.; RUSSIN, W.A. Structurally, Phloem unloading in the maize leaf cannot be symplastic. **American Journal of Botany**, v.80, n.11, p.1310-1317, 1993.

FERNANDEZ, R.T.; PERRY, R.L.; FLORE, J.A. Drought response of young apple trees on three rootstocks. II. Gas exchange, chlorophyll fluorescence, water relations, and leaf abscisic acid. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.122, n.2, p.841-848, 1997.

FURBANK, R.T.; PRITCHARD, J.; JENKINS, C.L.D. Effects of exogenous sucrose feeding on photosynthesis in the C₃ plant tobacco and the C₄ plant *Flaveria bidentis*. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.24, n.3, p.291-299, 1997.

GALTIER, N.; FOYER, C.H.; HUBER, J.; VOELKER, T.A.; HUBER, S.C. Effects of elevated sucrose-phosphate synthase activity on photosynthesis, assimilate partitioning, and growth in tomato (*Lycopersicon esculentum* var. UC82B). **Plant Physiology**, v.101, n.2, p.535-543, 1993.

GENTY, B.; BRIANTAIS, J.M.; BAKER, N.R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.990, p.87-92, 1989.

GERDEMANN, J.W. Vesicular-arbuscular mycorrhizae. In: TORREY, J.G.; CLARKSON, D.T. (Ed.). **The development and function of roots**. London: Academic Press, p.575-591, 1975

- GIOVANETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, vol.84, p.489-500, 1980.
- GLASZIOU, K.T. Control of enzyme formation and inactivation in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v.20, p.63-87, 1969.
- GOLDSCHMIDT, E.E.; HUBER, S.C. Regulation of photosynthesis by end-product accumulation in leaves of plants storing starch, sucrose, and hexose sugars. **Plant Physiology**, v.99, p.1443-1448, 1992.
- GOMES, V.F.F. Desenvolvimento de fungos micorrízicos arbusculares em três espécies de porta-enxertos cítricos sob níveis de fósforo. Piracicaba, 1997. 89p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- GRAHAM, J.H.; DUNCAN, L.W.; EISSENSTAT, D.M. Carbohydrate allocation patterns in citrus genotypes as affected by phosphorus nutrition, mycorrhizal colonization and mycorrhizal dependency. **New Phytologist**, v.135, n.2, p.335-343, 1997.
- GRAHAM, J.H.; EISSENSTAT, D.M. Host genotype and the formation and function of VA mycorrhizae. **Plant and Soil**, v.159, n.1, p.179-185, 1994.
- GRAHAM, J.H.; LEONARD, R.T.; MENGE, J.A. Membrane-mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. **Plant Physiology**, v.68, n.3, p.548-552, 1981.
- GRAHAM, J.H.; EISSENSTAT, D.M.; DROUILLARD, D.L. On the relationship between a plant's mycorrhizal dependency and rate of vesicular-arbuscular

- mycorrhizal colonization. **Funct. Ecol.**, v.5, p.773-779, 1991.
- HAYMAN, D.S. Influence of soils and soil fertility on activity and survival of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Phytopathology*, vol.72, p.1119-1125, 1982.
- HALL, J.R.; SCOTT, R.S.; JOHNSTNE, P.D. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizas on response of "Grasslands Huia" and "Tamar" white clovers to phosphorus. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v.20, p.549-555, 1977.
- HAMPP, R.; SCHAEFFER, C.; WALLEND, T.; STÜLTEN, C.; JOHANN, P.; EINIG, W. Changes in carbon partitioning or allocation due to ectomycorrhiza formation: biochemical evidence. **Canadian Journal of Botany**, v.73, n.1 (Suppl.), p. S548-S556, 1995.
- HAMPP, R.; EGGER, B.; EFFENBERGER, S.; EINIG, W. Carbon allocation in developing spruce needles. Enzymes and intermediates of sucrose metabolism. **Physiologia Plantarum**, v.90, n.2, p.299-306, 1994.
- HAMPP, R.; EINIG, W.; KEIL, R. Profile biochemischer parameter in pflanzlichen gewebe und zellen mit unterschiedlich ausgeprägten schadsymptomen. **Kernforschungszentrum Karlsruhe, KfK-PEF**, n.32, p.1-48, 1987.
- HARBINSON, J.; GENTY, B.; BAKER, N.R. The relationship between CO₂ assimilation and electron transport in leaves. **Photosynthesis Research**, v.25, p.213-224, 1990.
- HARLEY, J.L.; SMITH, S.E. **Mycorrhizal symbiosis**. New York: Academic Press, 1983. 286p.

- HARRIS, D.; PACOVSKY, R.S.; PAUL, E.A. Carbon economy of soybean-*Rhizobium-Glomus* associations. **New Phytologist**, v.101, p.427-440, 1985.
- HARRIS, D.; PAUL, E.A. Carbon requirements of vesicular-arbuscular mycorrhizal. In: SAFIR, G.R. (Ed.). **Ecophysiology of VA mycorrhizal plants**. . Boca Raton: C.R.C. Press, 1987. p.93-105.
- HEINEKE, D.; STITT, M.; HELDT, H.W. Effect to inorganic phosphate on the light-dependent thylakoid energization of intact spinach chloroplasts. **Plant Physiology**, v.91, p.221-226, 1989.
- HEPPER, C.M. A calorimetric method for estimating vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **Soil Biology and Biochemistry**, v.9, p.15-18, 1977.
- HEROLD, A.; WALKER, D.A. Transport across chloroplast envelopes the role of phosphate. In: GIEBISH, G.; TOSTESON, D.C.; USSING, H.H. (Ed.). **Membrane transport in biology**. Berlin: Spring-Verlag, 1979. p.411-439.
- HERS, H.G.; SCHAFTINGEN, E.V. Fructose 2,6-bisphosphate 2 years after its discovery. **Biochemical Journal**, v.206, p.1-12, 1982.
- HOFFMANN, E.; WALLEND, T.; SCHAEFFER, C.; HAMPP, R. Cyclic AMP, a possible regulator of glycolysis in the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. **New Phytologist**, v.137, n.2, p.351-356, 1997.
- HOWELER, R.H. The effect of mycorrhizal inoculation on the phosphorus nutrition of cassava. In: RUSSEL, R.S.; IGUE, K.; MEHTA, Y.R. (Eds.). **The soil/root system in relation to Brazilian Agriculture**. Londrina, IAPAR, 1981, p.243-258.
- HUBER, J.L.; HITE, D.R.; OUTLAW Jr., W.H.; HUBER, S.C. Inactivation of highly

- activated spinach leaf sucrose-phosphate synthase by dephosphorylation. **Plant Physiology**, v.95, n.1, p.291-297, 1991.
- HUBER, S.C.; HUBER, J.L. Role and reugulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v.47, p.431-444, 1996.
- HUBER, S.C.; HUBER, J.L. Role of sucrose-phosphate synthase in sucrose metabolism in leaves. **Plant Physiology**, v.99, p.1275-1278, 1992.
- JACOB, J.; LAWLOR, D.W. Dependence of photosynthesis of sunflower and maize leaves on phosphate supply, ribulose-1,5-*bis*phosphate carboxylase/oxygenase activitiy and ribulose-1,5- *bis*phosphate pool size. **Plant Physiology**, v.98, p.801-807, 1992.
- JAKOBSEN, I. Transport of phosphorus and carbon in VA mycorrhizas. In: VARMA, A.; HOCK, B. (Eds.) **Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.297-324.
- JANG, J.C.; SHEEN, J. Sugar sensing in higher plants. **The Plant Cell**, v.6, n.11, p.1665-1679, 1994.
- KIERNAN, J.M., HENDRIX, J.W.; MARONEK, D.M. Fertilizer-induced pathogenity of mycorrhizal fungi to sweetgum seedlings. **Soil Biology and Biochemistry**, v.15, p.257-262, 1983.
- KOCH, K.E. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.47, p.509-540, 1996.
- KOCH, K.E.; JOHNSON, C.R. Photosynthesis partitioning in split-root citrus seedlings

- with mycorrhizal and nonmycorrhizal root systems. **Plant Physiology**, v.73, n.1, p.26-30, 1984.
- KOCH, K.E.; WU, Y.; XU, J. Sugar and metabolic regulation of genes for sucrose metabolism: potential influence of maize sucrose synthase and soluble invertase responses on carbon partitioning and sugar sensing. **Journal of Experimental Botany**, v.47, Special Issue, p.1179-1185, 1996.
- KOIDE, R.T.; LI, M. On host regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, v.114, p.59-74, 1990.
- KOIDE, R.T. The nature of growth depression in sunflower caused by vesicular-arbuscular mycorrhizal infection. **New Phytologist**, v.99, p.449-462, 1985.
- KOOTEN, O. VAN; SNEL, J.F.H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. **Photosynthesis Research**, v.25, p.147-150, 1990.
- KOSKE, R.E. A preliminary study of interactions between species of vesicular-arbuscular fungi in a sand dune. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, v.76, p.411, 1981.
- KOTHARI, S.K.; MARSCHNER, H.; GEORGE, E. Effect of VA mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms on root and shoot morphology, growth and water relations in maize. **New Phytologist**, v.116, p.303-311, 1990.
- KRAUSE, G.H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II. Interpretation of fluorescence signals. **Photosynthesis Research**, v.5, n.2, p.139-157, 1984.
- KUCEY, R.M.N.; PAUL, E.A. Carbon flow, photosynthesis, and N₂ fixation in mycorrhizal and modulated faba beans (*Vicia faba* L.). **Soil Biology and**

Biochemistry, v.14, p.407, 1982.

LAMBAIS M.R.; MEHDY, M.C. Suppression of endochitinase, β -1,3-endoglucanase, and chalcone isomerase expression in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.6, n.1, p.75-83, 1993.

LAMBAIS, M.R.; MEHDY, M.C. Differential expression of defense-related genes in arbuscular mycorrhiza. **Canadian Journal of Botany**, v.73, p.S533-S540, 1995.

LEE, H.S.; STURM, A. Purification and characterization of neutral and alkaline invertase from carrot. **Plant Physiology**, v.112, n.4, p.1513-1522, 1996.

LEVY, Y.; KRIKUN, J. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhiza on *Citrus jambhiri* water relations. **New Phytologist**, vol.85, p.25-31, 1980.

LOEWE, A.; EINIG, W.; HAMPP, R. Coarse and fine control and annual changes of sucrose-phosphate synthase in norway spruce needles. **Plant Physiology**, v.112, n.2, p.641-649, 1996.

LOPES, E.S.; OLIVEIRA, E.; NEPTUNE, A.M.L.; MORAES, F.R.P. Efeito da inoculação do cafeeiro com diferentes espécies de fungos micorrizicos vesicular-arbusculares. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.7, p.137-141, 1983.

LOVELOCK, C.E.; KYLLO, D.; POPP, M.; ISOPP, H.; VIRGO, A.; WINTER, K. Symbiotic vesicular-arbuscular mycorrhizae influence maximum rates of photosynthesis in tropical tree seedlings grown under elevated CO₂. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.24, n.2, p.185-194, 1997.

MACHADO, E.C. Eficiência fotossintética. In: SEMINÁRIO DE BIOTECNOLOGIA

- AGRÍCOLA, Piracicaba, 1985. **Anais**. Piracicaba: FEALQ, 1985. p.175-200.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2.ed. San Diego: Academic Press, 1995. cap.15, p.537-595: The soil-root interface (rhizosphere) in relation to mineral nutrition.
- MARTIN, F.; RAMSTEDT, M.; SÖDERHÄLL, K.; CANET, D. Carbohydrate and Amino Acid Metabolism in the Ectomycorrhizal Ascomycete *Sphaerospora brunnea* during Glucose Utilization. **Plant Physiology**, v.86, p.935-940, 1988.
- MARTIN, F.; CANET, D.; MARCHAL, J.P. In vivo natural abundance carbon¹³ NMR studies of the carbohydrate storage in ectomycorrhizal fungi. **Physiologie Vegetale**, v.22, p.733-744, 1984.
- MATHEWS, C.K.; VAN HOLDE, K.E. **Biochemistry**, 2° edição. Menlo Par, Califórnia: The Benjamim/Cummings Publishing Company, Inc, 1995, 1159 p.
- MATHUR, N.; VYAS, A. I. Influence of VA mycorrhizae on net photosynthesis and transpiration of *Ziziphus mauritiana*. **Journal of Plant Physiology**, v.147, n.3-4, p.328-330, 1995.
- MELLONI, R. Quantificação de micélio extrarradicular de fungos micorrízicos arbusculares em plantas citricas. Piracicaba, 1996. 83p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superioir deAgricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo.
- MENGE, J.A.; JARREL, W.M.; LABANAUSKAS, C.K.; OJALA, J.C.; HUSZAR, C.; JOHNSON, E.L.V.; SIBERT, D. **Soil Scince Society of American Journal**, v.46, n.3, p.762-768, 1982.
- MÖLLER, I.; BECK, E. The fate of apoplastic sucrose in sink and source leaves of

- Urtica dioica*. **Physiologia Plantarum**, v.85, n.4, p.618-624, 1992.
- MORRIS, D.A. Hormonal regulation of sink invertase activity: implications for the control of assimilate partitioning. In: WAREING, P.F. (ed.). **INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT GROWTH SUBSTANCES**, 11., Aberystwyth, 1982. **Proceedings**. New York: Academic Press, 1983. p.659-668.
- MORRIS, D.A.; ARTHUR, E.D. Invertase activity, carbohydrate metabolism and cell expansion in the stem of *Phaseolus vulgaris* L. **Journal of Experimental Botany**, v.36, n.165, p.623-633, 1985.
- MOSSE, B. The regular germination of resting spores and some observations on growth requirements of an *Endogone* sp. causing vesicular-arbuscular mycorrhiz. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, v.42, p.273-286, 1959.
- MOSSE, B. Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. **Annual Review of Phytopathology**, v.11, p.171-196, 1973a.
- MOSSE, B. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. **New Phytologist**, v.72, p.127-136, 1973b.
- NAGY, S.; NORDY, H.E.; NEMEC, S. Composition of lipids in roots of six citrus cultivars infected by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus mosseae*. **New Phytologist**, v.85, p.377-384, 1980.
- NASYROV, Y.S. Genetic control of photosynthesis and improving of crop productivity. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, vol.29, p.215-236, 1978.
- NEMEC, S.; GUY, G. Carbohydrate status of mycorrhizal and nonmycorrhizal citrus

- rootstocks. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.107, n.2, p.177-180, 1982.
- NEWMAN, E.I. A method for estimating the total length of root in a sample. **Journal of Applied Ecology**, vol.3, p.139-145, 1966.
- PANG, P.C.; PAUL, E.A. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhiza ^{14}C and ^{15}N distribution in nodulated fababeans. **Canadian Journal Soil Science**, v.60, n.2, p.241-250, 1980.
- PENG, S.; EISSENSTAT, D.M.; GRAHAM, J.H.; WILLIAMS, K.; HODGE, N.C. Growth depression in mycorrhizal citrus at high-phosphorus supply. **Plant Physiology**, v.101, n.3, p.1063-1071, 1993.
- PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and stainings parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assesment of infection. **Transactions of the British of Mycological Society**, vol.55, n.1, p.158-160, 1970.
- PLENISCAR, M.; KASTORI, R.; PETROVIC, N.; PANKOVIC, D. Photosynthesis and chlorophyll fluorescence in sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves as affected by phosphorus nutrition. **Journal of Experimental Botany**, v.45, n.276, p.919-924, 1994.
- POOVAIAH, B.W.; VELUTHAMBI, K. Auxin-regulated invertase activity in strawberry fruits. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.110, n.2, p.258-261, 1985.
- PRADEL, K.S.; REZMER, C.; KRAUSGRILL, S.; RAUSCH, T.; ULLRICH, C.I. Evidence for symplastic phloem unloading with concomitant high activity of acid

- cell wall invertase in agrobacterium tumefaciens-induced plant tumors. **Botanica Acta**, v.109, p.397-404, 1996.
- RAMSTEDT, M.; JIRJIS, R.; SÖDERHALL, K. Metabolism of mannitol in mycorrhizal and non-mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v.105, p.281-288, 1987.
- RANWALA, A.P.; SUEMATSU, C.; MASUDA, H. Soluble and wall-bound invertases in strawberry fruit. **Plant Science**, v.84, n.1, p.59-64, 1992.
- RATNAYAKE, M.; LEONARD, R.T.; MENGE, J.A. Root exudation in relation to supply of phosphorus and its possible relevance to mycorrhiza formation. **New Phytologist**, v.81, p.533-552, 1978.
- RAYLE, D.L.; CLELAND, R.E. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. **Plant Physiology**, v.99, p.1271-1274, 1992.
- REIMHOLZ, R.; GEIGENBERGER, P.; STITT, M. Sucrose-phosphate synthase is regulated via metabolites and protein phosphorylation in potato tubers, in a manner analogous to the enzymes in leaves. **Planta**, v.192, n.4, p.480-488, 1994.
- RICHARDSON, D.L.; DAVIES, H.V.; ROSS, H.A.; MACKAY, G.R. Invertase activity and its relation to hexose accumulation in potato tubers. **Journal of Experimental Botany**, v.41, n.222, p.95-99, 1990.
- ROBINSON, D. G. SuSy ergo GluSy: new developments in the field of cellulose biosynthesis. **Botanica Acta**, v. 109, p.261-263, 1996.
- RUFFNER, H.P.; ADLER, S.; RAST, D.M. Soluble and wall associated forms of invertase in *Vitis vinifera*. **Phytochemistry**, v.29, n.7., p.2083-2086, 1990.

- RYGIEWICZ P.T.; ANDERSEN, C.P. Mycorrhizae alter quality and quantity of carbon allocated below ground. **Nature**, v.369, p.58-60, 1994.
- SALZER, P.; HAGER, A. Characterization of wall-bound invertase isoforms of *Picea abies* cells and regulation by ectomycorrhizal fungi. **Physiologia Plantarum**, v.88, n.1, p.52-59, 1993.
- SCHAEFFER, C.; WALLEND, T.; GUTTENBERGER, M.; HAMPP, R. Acid invertase in mycorrhizal and non-mycorrhizal roots of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) seedlings. **New Phytologist**, v.129, n.3, p.417-424, 1995.
- SCHAFFER, A.A.; SAGEE, O.; GOLDSCHMIDT, E.E.; GOREN, R. Invertase and sucrose synthase activity, carbohydrate status and endogenous IAA levels during *Citrus* leaf development. **Physiologia Plantarum**, v.69, n.1, p.151-155, 1987.
- SCHREIBER, U.; ENDO, T.; MI, H.; ASADA, K. Quenching analysis of chlorophyll fluorescence by the saturation pulse method: particular aspects relating to the study of eukaryotic algae and cyanobacteria. **Plant Cell Physiology**, v.36, n.5, p.873-882, 1995.
- SCHUBERT, A.; WYSS, P.; WIEMKEN, A. Occurrence of Trehalose in Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi and in Mycorrhizal Roots. **Plant Physiology**, v.140, p.41-45, 1992.
- SCHWAB, A.; MARZACHI, C.; MAZZITELLI, M.; CRAVERO, M.C.; BONFANTE-FASOLO, P. Developmemt of total and viable extraradical mycelium in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus clarum* Nicol. & Schench. **New Phytologist**, vol.107, p.183-190, 1987.
- SCHWAB, S.M.; MENGE, J.A.; TINKER, P.B. Regulation of nutrient transfer between

host and fungus in vesicular-arbuscular mycorrhizas. **New Phytologist**, v.117, p.387-398, 1991.

SHACHAR-HILL, Y.; PFEFFER, P.E.; DOUDS, D.; OSMAN, S.F.; DONER, L.W.; RATCLIFFE, R.G. Partitioning of intermediary carbon metabolism in vesicular-arbuscular mycorrhizal leek. **Plant Physiology**, v.108, p.7-15, 1995.

SIQUEIRA, J.O.; COLOZZI FILHO, A. Micorrizas vesículo-arbusculares em mudas de cafeeiro. Efeito do fósforo no estabelecimento e funcionamento da simbiose. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.10, p.207-211, 1986.

SIQUEIRA, J.O.; HUBBELL, D.H.; SCHENCK, N.C. Spore germination and germ tube growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *in vitro*. **Mycologia**, v.74, n.6, p.952-959, 1982.

SMITH, S.E.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.39, p.221-244, 1988.

SMITH, S.E. Mycorrhizas of autotrophic higher plants. **Biological Review**, v.55, p.475-510, 1980.

SMITH, S.E.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Phosphate uptake and arbuscular activity in mycorrhizal *Allium cepa* L.: effects of photon irradiance and phosphate nutrition. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.17, p.177-188, 1990.

SNELGROVE, R.C.; SPLITTSTOESSER, W.E.; STRIBLEY, D.P.; TINKER, P.B. The distribution of carbon and the demand of fungal symbiont in leek plants with vesicular-arbuscular mycorrhizas. **New Phytologist**, v.92, n.1, p.75-87, 1982.

- SON, C.L.; SMITH, S.E. Mycorrhizal growth responses: interactions between photon irradiance and phosphorus nutrition. **New Phytologist**, v.108, n3, p.305-314, 1988.
- SONNEWALD, U.; WILLMITZER, L. Molecular approaches to sink-source interactions. **Plant Physiology**, v.99, p.1267-1270, 1992.
- SPANU, P.; BOLLER, T.; LUDWIG, A.; WIEMKEN, A.; FACCIO, A.; BONFANTE-FASOLO, P. Chitinase in roots of mycorrhizal *Allium porrum*: regulation and localization. **Planta**, v.177, p.447-455, 1989.
- SRIVASTAVA, A.; GREPPIN, H.; STRASSER, R. The steady state chlorophyll *a* fluorescence exhibits in vivo an optimum as a function of light intensity which reflects the physiological state of the plant. **Plant Cell Physiology**, v.36, n.5, p.839-848, 1995.
- STITT, M.; SCHAEWEN, A.; WILLMITZER, L. "Sink" regulation of photosynthetic metabolism in transgenic tobacco plants expressing yeast invertase in their cell wall involves a decrease of the Calvin-cycle enzymes and increase of glycolytic enzymes. **Planta**, v.183, n.1, p.40-50, 1990.
- STITT, M.; WILKE, I.; FEIL, R.; HELDT, H.W. Coarse control of sucrose-phosphate synthase in leaves: Alterations of the kinetic properties in response to the rate of photosynthesis and the accumulation of sucrose. **Planta**, v.174, n.2, p.217-230, 1988.
- STITT, M.; WIRITZ, W.; HELDT, H.W. Regulation of sucrose synthesis by cytoplasmic fructosebisphosphatase and sucrose phosphate synthase during photosynthesis in varying light and carbon dioxide. **Plant Physiology**, v.72, n.3, p.767-774, 1983.

- STRIBLEY, D.P.; TINKER, P.B.; RAYNER, J.H. Relation of internal phosphorus concentration and plant weight in plants infected by vesicular-arbuscular mycorrhizas. **New Phytologist**, v.86, n.3, p.261-266, 1980.
- SUN, Y.; HAVLIN, J.L.; PAULSEN, G.M. Evaluation of nutrient deficiencies in wheat seedlings by chlorophyll fluorescence. **Journal of Plant Nutrition**, v.12, n.6, p.769-782, 1989.
- SYLVIA, D.M. Activity of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhiza fungi. **Soil Biology Biochemistry**, vol.20, p.39-43, 1988.
- TERRY, N.; ULRICH, A. Effects of phosphorus deficiency on photosynthesis and respiration of leaves of sugar beet. **Plant Physiology**, v.51, p.43-47, 1973.
- THOMSON, B.D.; CLARKSON, D.T.; BRAIN, P. Kinetics of phosphorus uptake by the germ-tubes of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. **New Phytologist**, v.116, p.647-653, 1990.
- THOMSON, B.D.; ROBSON, A.D.; ABBOTT, L.K. Mycorrhizas formed by *Gigaspora calospora* and *Glomus fasciculatum* on subterranean clover in relation to soluble carbohydrate concentrations in roots. **New Phytologist**, v.114, n.2, p.217-225, 1990.
- TINKER, P.B. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and plant growth. **Physiologie Vegetale**, v.16, p.743, 1978.
- TOIVONEN, P.; VIDAVER, W. Variable chlorophyll *a* fluorescence and CO₂ water-stressed white spruce seedlings. **Plant Physiology**, v.86, p.744-748, 1988.
- TRISSEL, H.W.; WILHELM, C. Why do thylakoid membranes from higher plants form

grana stacks ? **Trends in Biochemical Sciences**, v.18, p.415-419, 1993.

TURGEON, R.; BEEBE, D.U. The evidence for symplastic phloem loading. **Plant Physiology**, v.96, n.1, p.349-354, 1991.

WALKER, D. **The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis**. Sheffield: Oxygraphics, 1990. 203p.

WALKER, D.A.; ROBINSON, S.P. Regulation of photosynthetic carbon assimilation. In: SIEGELMAN, H.W.; HIND, G. (Eds.) **Photosynthetic carbon assimilation**. New York: Plenum Press, 1978. p.43-59. (Basic Life Sciences, 11)

WALKER, J.L.; HUBER, S.C. Regulation of sucrose-phosphate-synthase activity in spinach leaves by protein level and covalent modification. **Planta**, v.177, n.1, p.116-120, 1989.

WEIL, M.; RAUSCH, T. Cell wall invertase in tobacco crown gall cells: enzyme properties and regulation by auxin. **Plant Physiology**, v.94, n.4, p.1575-1581, 1990.

WEINER, H.; McMICHAEL Jr.; HUBER, S.C. Identification of factors regulating the phosphorylation status of sucrose-phosphate synthase *in vivo*. **Plant Physiology**, v.99, p.1435-1442, 1992.

WOOLHOUSE, H.W. Membrane structure and transport problems considered in relation to phosphorus and carbohydrate movements in the regulation of antotrophic mycorrhizal associations. In: SANDERS, F.E.; MOSSE, B.; TINKER, P.B. (Eds.). **Endomycorrhizas**. London: Academic Press, 1975. p.209-239.

WORRELL, A.C.; BRUNEAU, J.M.; SUMMERFELT, K.; BOERSIG, M.; VOELKER,

T. Expression of a maize sucrose phosphate synthase in tomato alters leaf carbohydrate partitioning. **The Plant Cell**, v.3, n.10, p.1121-1130, 1991.

ZAMSKI, E.; BARNEA, A. Characterization of sucrose phosphate synthase, sucrose synthase and invertase in roots of two nearly isogenic carrot lines that differ in their capacity to accumulate sucrose. **Journal of Plant Physiology**, v.149, n.3-4, p.301-306, 1996.