

BIOPRODUÇÃO DE AJMALICINA EM *Catharanthus roseus*
INOCULADAS COM MICORRIZAS ARBUSCULARES E
ADUBADAS COM NITROGÊNIO E FÓSFORO

CECILIA SILVA MONNERAT

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
Setembro – 2011

BIOPRODUÇÃO DE AJMALICINA EM *Catharanthus roseus*
INOCULADAS COM MICORRIZAS ARBUSCULARES E
ADUBADAS COM NITROGÊNIO E FÓSFORO

CECILIA SILVA MONNERAT

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias da Universidade Estadual do
Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte
das exigências para a obtenção do título de
Doutor em Ciências Naturais”.

Orientador: Prof. Ivo José Curcino Vieira
Co-Orientador: Prof. Raimundo Braz-Filho

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
Setembro – 2011

BIOPRODUÇÃO DE AJMALICINA EM *Catharanthus roseus*
INOCULADAS COM MICORRIZAS ARBUSCULARES E
ADUBADAS COM NITROGÊNIO E FÓSFORO

CECILIA SILVA MONNERAT

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias da Universidade Estadual do
Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como
parte das exigências para a obtenção do
título de Doutor em Ciências Naturais”.

Aprovada em 23 de setembro de 2011.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Lanamar de Almeida Carlos (D.Sc., Produção Vegetal) – UFSJ

Prof^a. Marta Simone Mendonça Freitas (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF

Prof^a. Maria Raquel Garcia Vega (D.Sc., Química Orgânica) - UENF

Prof. Raimundo Braz-Filho (Ds., Química Orgânica) – UENF
Co-Orientador

Prof. Ivo José Curcino Vieira (Ds., Química Orgânica) – UENF
Orientador

*“Tu te tornas eternamente responsável por
aquilo que cativas”*

(Antoine de Saint-Exupéry)

Dedico ao meu esposo Savio, que me proporciona a felicidade de formarmos uma família, da qual tenho orgulho e que geraram frutos: Antônio que nos traz muitas alegrias e sua irmã, Maria, que em breve será motivo de mais alegrias.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida.

Ao Savio, que sempre presente, incentivou nos momentos de desânimo, e sempre acreditou em mim, apoiando-me e cuidando de nossa família.

Aos meus pais, irmãos, sobrinhos, cunhados, meu sogro e minha sogra, que mesmo distante tiveram compreensão e deram-me conforto e carinho.

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro pela oportunidade.

Ao Prof. Ivo José Curcino Vieira, pela orientação e confiança dando-me a oportunidade de desenvolver este trabalho, proporcionando grandes momentos de aprendizagem.

A Prof^a Marta Simone Mendonça Freitas pela disposição a todo momento, pelo apoio e pelos longos momentos de conversa e dedicação a este trabalho.

Aos profs Raimundo Braz Filho, e Maria Raquel Garcia Vega, pela

disponibilidade neste momento tão importante.

A Prof^a. Lanamar de Almeida Carlos que gentilmente cedeu sua amostra de ajmalicina, imprescindível para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do LCQUI, Lara, Ju, Marina, Hádria, Elaine, Heloísa, Milena, Vinícius, Amanda, Jéssica, Michele, Virgínia e a tantos outros que em algum momento, tornaram os dias de trabalho ainda mais agradáveis.

A técnica Andréia, pela disponibilidade e auxílio na realização de algumas análises no laboratório de Microbiologia do Solo.

SUMÁRIO

RESUMO.....	IX
ABSTRAT.....	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
3.1. <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don.....	6
3.2. Alcalóides.....	9
3.3. Fungos Micorrizas Arbusculares (FMAs).....	12
3.4. Adubação fosfatada x FMAs x Alcalóides.....	15
3.5. Adubação nitrogenada x FMA x Alcalóides.....	17
4. ARTIGO Nº 1	
Bioprodução de ajmalicina em <i>Catharanthus roseus</i> Inoculadas com Micorrizas Arbusculares e Adubadas com nitrogênio.....	19
5. ARTIGO Nº2	
Bioprodução de Ajmalicina em <i>Catharanthus roseus</i> Inoculadas com Micorrizas Arbusculares e Adubadas com Fósforo.....	46
6. RESUMO E CONCLUSÕES.....	68

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
8. APENDICE.....	76

RESUMO

MONNERAT, Cecilia Silva; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Setembro de 2011; Bioprodução de alcalóides em *Catharanthus roseus* inoculadas com micorrizas arbusculares e adubadas com nitrogênio e fósforo. Orientador: Prof. Ivo José Curcino Vieira; Co-orientação: Prof^a Marta Simone Mendonça Freitas

Foram instalados dois experimentos em casa de vegetação no município de Campos dos Goytacazes - RJ. O primeiro experimento teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes espécies de FMAs sobre o crescimento, composição mineral e teores de alcalóides em raízes de *Catharanthus roseus* (L.) G. DON, cultivada em diferentes doses de nitrogênio. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados em arranjo fatorial 4 x 4, sendo três tratamentos microbiológicos [*Glomus etunicatum*, *Glomus intraradices*, inóculo misto (*Glomus clarum* e *Gigaspora margarita*)] e sem fungo e quatro doses de nitrogênio (15, 30, 60 e 120 mg Kg⁻¹ de solo), com quatro repetições. A unidade experimental foi composta por um vaso contendo 4 kg de substrato e quatro plantas por vaso. As plantas foram colhidas com 90 dias após o plantio, em pleno florescimento. Determinou-se a altura, número de folhas, massa seca da

parte aérea e raiz, porcentagem de colonização micorrízica nas raízes, teores de N, P, K, Ca, Mg e ajmalicina nas raízes. Os resultados demonstram que plantas de vinca inoculadas com inóculo misto e *G. etunicatum* apresentaram maiores crescimento e maiores teores de na massa seca da parte aérea independente da dose de N utilizada. Os maiores teores de ajmalicina foram obtidos em raízes de vinca nos tratamentos inoculados com inóculo misto e *G. etunicatum* associado com a aplicação de 60 mg de N por Kg de solo. O segundo experimento teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes espécies de FMAs sobre o crescimento, composição mineral e teores de alcalóides em raízes de *Catharanthus roseus* (L.) G. DON, cultivada em diferentes doses de fósforo. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com quatro doses de fósforo (0, 50, 100 e 200 mg Kg⁻¹ de P na forma de KH₂PO₄) e dois tratamentos microbiológicos [*Glomus etunicatum*; inóculo misto (*Glomus clarum* e *Gigaspora margarita*) e sem fungo], com quatro repetições. A unidade experimental foi composta por um vaso contendo 4 Kg de substrato e quatro plantas por vaso. As plantas foram colhidas sessenta dias após o plantio, em pleno florescimento. Determinou-se a altura, número de folhas, massa seca da parte aérea e raiz, porcentagem de colonização micorrízica nas raízes, teores de N, P, K, Ca, Mg e ajmalicina nas raízes. Os maiores incrementos na altura, número de folhas, massa seca da parte aérea e raiz e teores de N, Ca e Mg foram obtidos na ausência de adubação fosfatada. Os maiores teores de P foram obtidos na dose de 200 mg de P. O maior teor e conteúdo de ajmalicina foi encontrado em plantas inoculadas com inoculo misto associado a uma aplicação de 50 mg de P por Kg de solo.

ABSTRACT

MONNERAT, Cecilia Silva; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; September, 2011; Bioproduction of alkaloids in *Catharanthus roseus* inoculated with arbuscular mycorrhiza and fertilized with nitrogen and phosphorus. Advisor: Prof. Ivo José Curcino Vieira; Counselor: Prof^a Marta Simone Mendonça Freitas

Two experiments were carried out in a greenhouse in the city of Campos dos Goytacazes - RJ. The first experiment was to evaluate the effects of different AMFs species on growth, mineral composition and content of alkaloids in *Catharanthus roseus* (L.) G. DON roots, grown in different nitrogen levels. The experimental design was randomized blocks in 4 x 4 factorial arrangement, with three treatments microbiological [*Glomus etunicatum*, *Glomus intraradices*, mixed inoculum (*Glomus clarum* and *Gigaspora margarita*)] and without fungi and four doses of nitrogen (15, 30, 60 and 120 mg Kg⁻¹ soil), With four replications. Experimental unit consisted of one pot containing 4 kg of substrate and four plants per pot. Plants were harvested 90 days after planting in full bloom. It was determined height, leaf number, dry mass of shoot and root, percentage of

mycorrhizal colonization in the roots, N, P, K, Ca, Mg and ajmalicina roots. The results demonstrate that vinca plants inoculated with mixed inoculum and *G.etunicatum* showed higher growth, higher levels in shoot dry mass independent of N dose. The results demonstrate that vinca plants inoculated with mixed inoculum and *G.etunicatum* showed higher growth, higher levels in shoot dry mass independent of N dose. The greatest concentration of ajmalicina in roots of vinca were obtained in treatments inoculated with mixed inoculums and *G. etunicatum* associated with the application of 60 mg N per kg soil. The second experiment aimed to evaluate the effects of different AMF species on growth, mineral composition and content of alkaloids in *Catharanthus roseus* (L.) G. DON roots, grown in different phosphorus levels. The experimental design was randomized blocks with four doses of phosphorus (0, 50, 100 and 200 mg P kg⁻¹ in the form of KH₂PO₄) and two microbiological treatments [*Glomus etunicatum*; mixed inoculum (*Glomus clarum* and *Gigaspora margarita*) and without fungus] with four replications. The experimental unit consisted of one pot containing 4 kg of substrate and four plants per pot. Plants were harvested sixty days after planting in full bloom. It was determined the height, leaf number, dry mass of shoot and root, percentage of mycorrhizal colonization in the roots, N, P, K, Ca, Mg and ajmalicine roots. The largest increases in height, leaf number, dry mass of shoots and roots and N, Ca and Mg were obtained in the absence of phosphorus. The increased levels of P were obtained at a dose of 200 mg of P. The largest content and content ajmalicine found in plants inoculated with mixed inoculum associated with an application of 50 mg P per kg soil.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCT / UENF

60/2011

Monnerat, Cecília Silva

Bioprodução de ajmalicina em *Catharanthus roseus* inoculadas com micorrizas arbusculares e adubadas com nitrogênio e fósforo / Cecília Silva Monnerat. – Campos dos Goytacazes, 2011.

xii, 87 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciências Naturais) --Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Ciências Químicas. Campos dos Goytacazes, 2011.

Orientador: Ivo José Curcino Vieira.

Co-orientador: Raimundo Braz-Filho.

Área de concentração: Química de Produtos Naturais.

Bibliografia: f. 71-76.

1. Alcalóides 2. *Glomus etunicatum* 3. Apocynaceae 4. *Glomus intraradices* 5. HPLC I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Ciências Químicas II. Título.

CDD 547.72

1

2

3

4

5

6

7

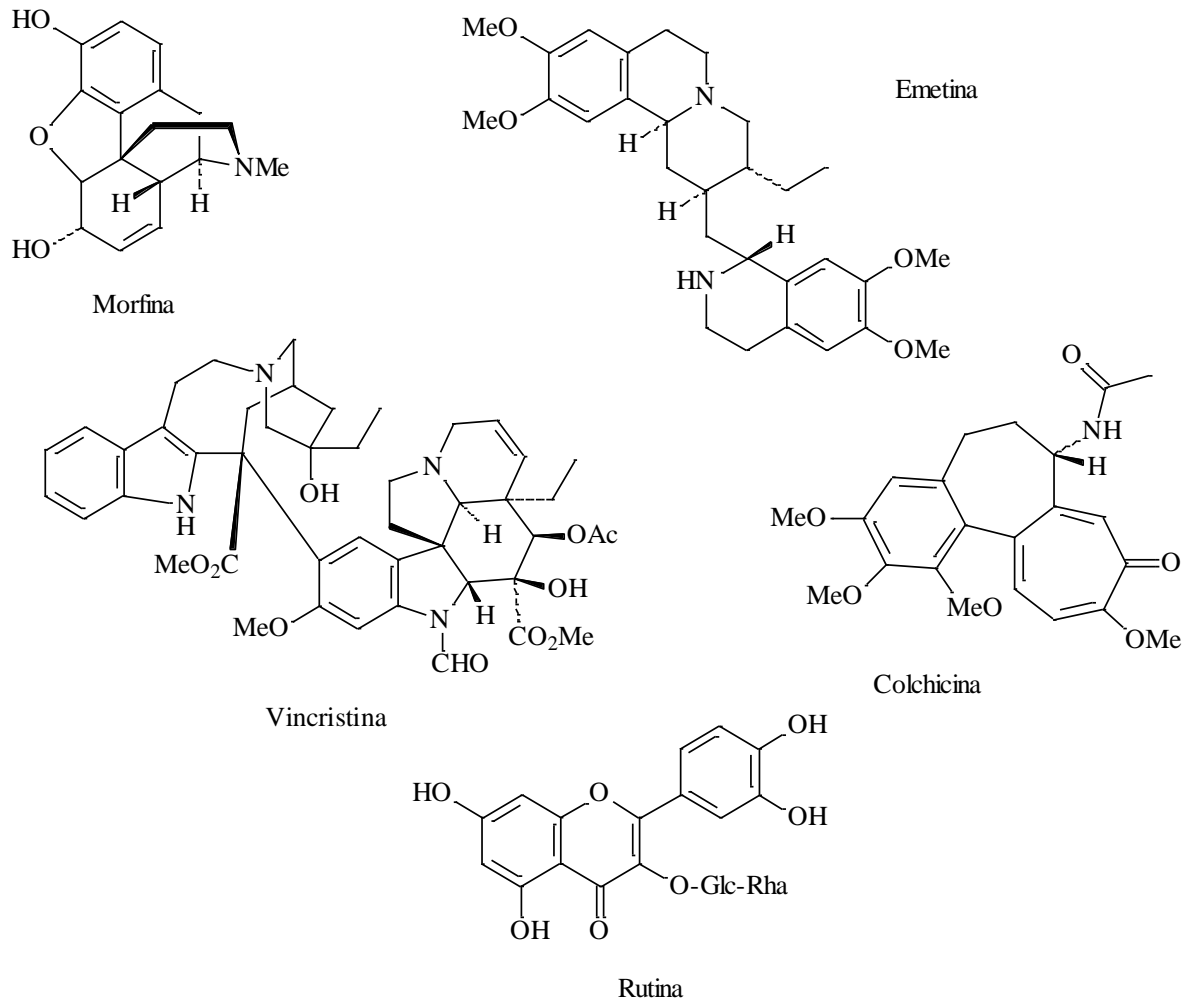
8

1. INTRODUÇÃO

9

10

11 As plantas, além de serem usadas na medicina popular com fins
12 terapêuticos, são importantes para obtenção de vários fármacos, até hoje
13 amplamente utilizado em clínicas, como morfina, emetina, vincristina, colchicina e
14 rutina (Figura 1). Embora muitos desses compostos possam ser sintetizados em
15 laboratório, tal síntese é tão complexa que os rendimentos são baixos e a
16 produção economicamente inviável.



1

2 **Figura 1:** Metabólitos secundários com ação farmacológica

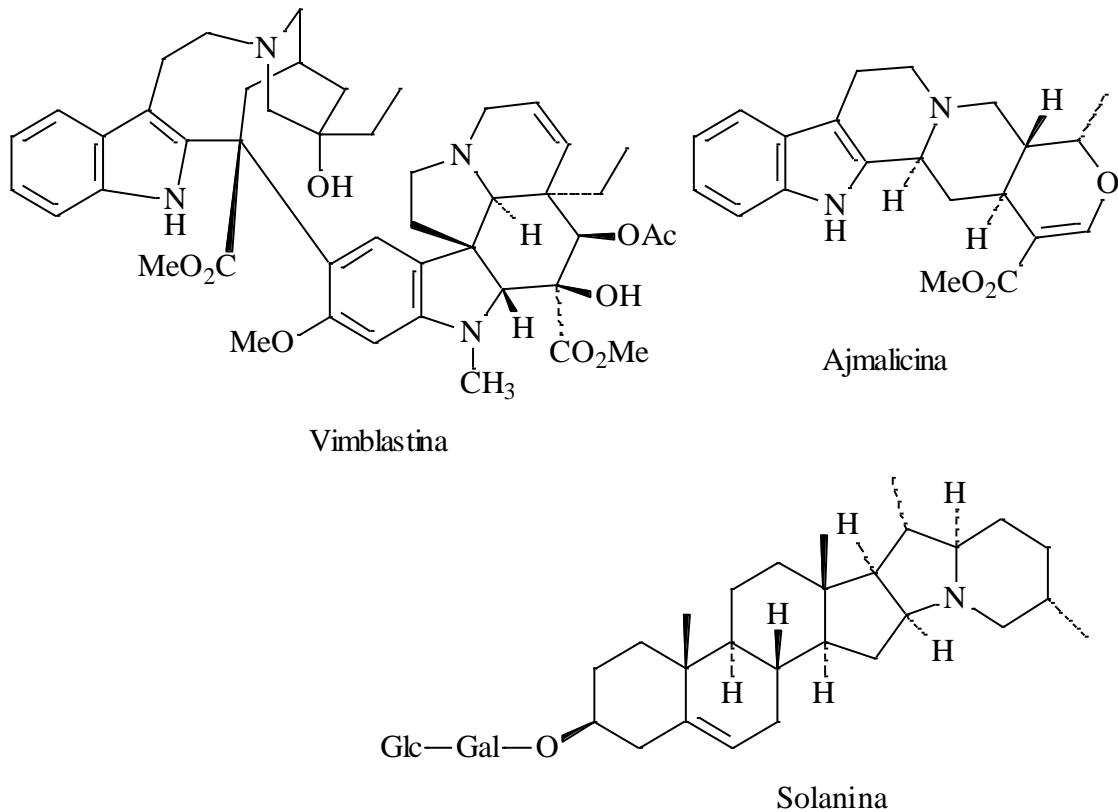
3

4 Dentre as diversas espécies de plantas estudadas, pode-se destacar a
 5 espécie *Catharanthus roseus* L. G. Don onde foram identificados mais de 130
 6 alcalóides, destacando-se vincristina e vimblastina (Figura 2), encontrados nas
 7 folhas, considerados de maior importância para a indústria farmacêutica, pois são
 8 utilizados no tratamento de leucemia e o alcalóide ajmalicina (Figura 2),
 9 encontrado nas raízes, e usada como antihiperternsivo (Kulkarni et al., 2004,
 10 Sottomayor et al., 2004). Nas plantas, os alcalóides possuem um comprovado
 11 papel na defesa contra a invasão de microrganismos. Esta função pode ser
 12 exemplificada pelo aumento da concentração de solanina (Figura 2) em batatas
 13 quando estas são atacadas por microrganismos (Henriques et al., 2004).

14

15

16



1

2

3

4

Figura 2: Alguns metabólitos secundários com efeitos de defesa devido à ação de patógenos

5

6

7

8

9

10

11

12

Os efeitos benéficos dos fungos micorrízicos arbusculares têm sido demonstrados nas mais variadas condições e espécies vegetais, na maioria dos casos, estimulando-se o crescimento vegetal como uma conseqüência de seu efeito sobre a nutrição da planta, principalmente no aumento da absorção de P (Freitas et al., 2006; Bressan et al., 2001; Smith e Read, 1997), N e K (Bressan et al, 2001, Gupta et al., 2002). Em condições controladas, Marschener e Dell (1994) verificaram que os fungos micorrízicos podem ser responsáveis pela absorção de cerca de 80% de P, 25% do N e 10% de K.

13

14

15

16

17

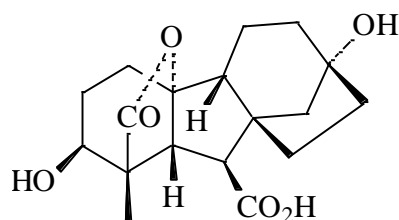
18

19

20

Além dos efeitos nutricionais as plantas micorrizadas exibem alterações metabólicas, fisiológicas e anatômicas diversas. Várias auxinas, citocininas, giberelinas e vitaminas acumulam-se em maior quantidade em plantas micorrizadas (Moreira e Siqueira, 2006). Torelli et al, (2000) demonstraram que tanto a inoculação com micorrizas quanto as adubações com fósforo induziram o acúmulo de citocininas em raízes e folhas. Shaul-Keinan et al. (2002) verificaram que a simbiose micorrízica altera as concentrações de giberelina e citocinina nas raízes de tabaco, tanto quantitativa como qualitativamente, sugerindo que um

1 novo equilíbrio de fitormônios da planta pode estar associado com eventos pre-
 2 simbióticos. Trabalhando com suspensão de células de *Catharantus roseus*,
 3 Amini et al, (2008) relataram que baixos níveis de ácido giberélico (Figura 3), que
 4 é produzido a partir da via do mevalonato, controlam a biossíntese de ajmalicina.
 5



6 Ácido giberélico

7 **Figura 3:** Fitormônio associado a eventos pré-simbióticos das associações
 8 micorrízicas
 9

10 A biossíntese dos metabólitos secundários e, conseqüentemente, dos
 11 princípios ativos em plantas depende de fatores genéticos, fisiológicos e
 12 ambientais. Uma estratégia para aumentar a produção desses compostos, seria o
 13 cultivo, levando em consideração os fatores ambientais. Dentre os fatores
 14 ambientais a inoculação com fungos micorrízicos arbusculares e adubação já
 15 foram citados por alguns autores (Al-Humaid, 2004, Sreevalli et al., 2004; Freitas
 16 et al., 2004, Kulkarni et al., 2004, Rojas-Andrade et al., 2003, Mazzafera, 1999;
 17 Peipp et al., 1997) como fatores importantes para incrementar esses metabólitos
 18 secundários. Sreevalli et al, (2004) realizaram estudos com *Catharanthus roseus*
 19 e verificaram que a adubação nitrogenada aumentou significativamente o
 20 conteúdo dos alcalóides em folhas e raízes. Karthikeyan et al (2008) confirmaram
 21 que a inoculação de fungos micorrizas arbusculares associado a doses de fósforo
 22 foram eficientes no incremento de biomassa e também no teor de ajmalicina em
 23 plantas de *Catharanthus roseus*.

24

25

26

27

28

29

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

2. OBJETIVOS

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes espécies de Fungos Micorrizas Arbusculares sobre o crescimento, composição mineral e teores de ajmalicina em raízes de *Catharanthus roseus* (L.) G. DON, cultivada em diferentes doses de nitrogênio e fósforo.

1

2

3

4

5

6

7

3. REVISÃO DE LITERATURA

8

9

10 **3.1. *Catharanthus roseus* (L.) G. DON**

11

12 O gênero *Catharanthus* é composto por oito espécies, sendo a
13 *Catharanthus roseus* L G. Don (Figura 4) a mais importante. É uma planta da
14 família Apocynaceae, nativa da ilha de Madagascar, que pode medir até 80 cm
15 de altura. Suas folhas são opostas de ápice arredondado, medindo de 5-9 cm de
16 comprimento (Lorenzi e Matos, 2002), bastante cultivada e utilizada como planta
17 ornamental em todo mundo desde 1950 (Moreno et al. 1995). No Brasil cresce
18 espontaneamente e é conhecida popularmente como boa-noite, boa tarde, vinca,
19 vinca-rósea.



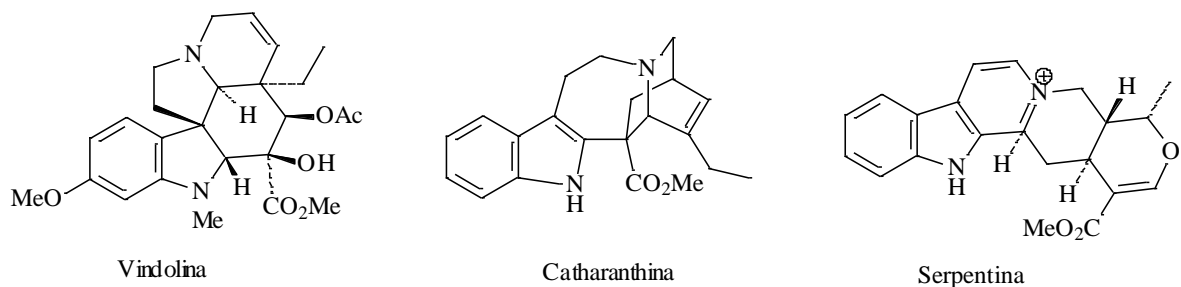
20 **Figura 4:** *Catharanthus roseus* L. Don

21

22 Alguns trabalhos descreveram as condições ideais de cultivo de
23 *Catharanthus roseus*. Shamim et al (1999) relataram que a melhor temperatura
24 para germinação de sementes, dependendo do meio de cultura, varia de 25°C a

1 30°C. A temperatura do ar deve ser cerca de 25°C no início do crescimento
 2 (aproximadamente 66 dias). Temperaturas acima de 30°C resultaram em uma
 3 diminuição da qualidade da colheita (Heinze, 1976). Tebet et al (1996) mostraram
 4 que o crescimento sob plena luz promoveu o melhor desenvolvimento, embora a
 5 luz solar não tenha afetado significativamente a concentração de vincristina nas
 6 folhas.

7 A razão principal do grande interesse em estudos fitoquímicos de
 8 *Catharanthus roseus* é a sua capacidade de sintetizar uma grande variedade de
 9 alcalóides indólicos terpenóides, que são valorizadas devido ao seu amplo
 10 espectro de efeitos farmacológicos. Três tipos de ação são particularmente
 11 importantes: diurético (vindolina, catharanthina) (Figura 5), hipotensor (ajmalicina,
 12 serpentina) (Figura 5), e anticancerígenos (vincristina e vinblastina) (Figura 5)
 13 (Kohlmuzer, 1968).



15
 16 **Figura 5:** Alcalóides isolados de *Catharanthus roseus* com efeito diurético:
 17 vindolina e catharanthina e anti-hipertensivo: serpentina.
 18

19 A planta produz mais de 130 alcalóides, distribuídos em todas as suas
 20 partes, mas em diferentes proporções. A concentração total de alcalóides na
 21 raízes é cerca de 2-3%, podendo atingir até 9% em raízes fibrosas, ao passo que
 22 as folhas contêm cerca de 1% de alcalóides. Uma quantidade muito pequena
 23 destes compostos foi encontrado em flores. Os alcalóides indólicos
 24 anticarcinogênicos vinblastina e vincristina estão presentes nas folhas, enquanto
 25 ajmalicina, usado como anti-hipertensivo (para a distúrbios circulatórios, pressão
 26 alta e doenças relacionadas) ou agentes sedativos, é encontrada nas raízes
 27 (Lata, 2007).

28 Segundo Schripsema et al., (2004), os alcalóides isolados da vinca,
 29 principalmente, vincristina e vinblastina, foram decisivos para iniciar a pesquisa
 30 no desenvolvimento de novos fármacos, devido tanto ao seu mecanismo de ação

1 único quanto a pouca resistência cruzada entre esses e às inúmeras modificações
2 estruturais possíveis.

3 Um dos principais problemas associados ao uso clínico de vimblastina e
4 vincristina é que somente quantidades muito pequenas destes alcalóides
5 desejáveis estão presentes na planta. Embora o conteúdo total de alcalóides da
6 folha pode chegar a 1% ou mais, em torno de 500 kg de *Catharanthus* é
7 necessária para produzir 1 g de vincristina. Esse rendimento (0,0002%) é o mais
8 baixo de qualquer alcalóide medicinalmente importante isolado com finalidade
9 comercial. A extração é cara e tediosa, já que exige grandes quantidades de
10 matéria-prima e uso extensivo de fracionamento cromatográfico (Dewick, 2002)

11 Apesar do grande esforço das grandes indústrias para conseguir a síntese
12 desses alcalóides a fim de centralizar sua produção, eles continuam sendo
13 obtidos a partir de cultivos da planta, pois a vincristina sintética usada no
14 tratamento da leucemia tem eficácia de apenas 20% em relação ao produto
15 natural, derivado da planta (Ratti et al., 2009). Devido a essas dificuldades
16 encontradas na obtenção dos alcalóides antileucêmicos, o custo deles é bastante
17 elevado. A produção mundial anual de vinblastina é de cerca de 12Kg e o seu
18 valor no mercado é de cerca de um milhão de dólares por kg. A vincristina atingiu
19 o preço de 3,5 milhões de dólares para 1 kg e sua produção anual é de 1 kg
20 (Loyola-Vargas et al. 2007). Os produtores aprendem a cultivá-la e preparar os
21 extratos brutos enriquecidos de alcalóides, que é todo exportado para fábricas
22 americanas sem limite de quantidade, pois são necessários 500 kg da planta
23 seca, ou seja, quatro toneladas da planta fresca, para obtenção de apenas um
24 grama do alcalóide antileucêmico (Lorenzi e Matos, 2002).

25 Na tentativa de melhorar a produção dos valiosos alcalóides, tais como
26 vincristina e vinblastina, vários estudos sobre *Catharanthus roseus* relataram
27 também o acúmulo de compostos fenólicos sobre estresse biótico e / ou abióticos.
28 O acúmulo de compostos fenólicos pode afetar outras vias dos metabólitos
29 secundárias incluindo as vias de alcalóides, através de um complexo sistema de
30 defesa da planta (Mustafa e Verpoorte, 2007).

31

32

33

1 **3.2 Alcalóides**

2

3 Dentro do grupo de metabólitos secundários são encontrados os
4 alcalóides, que são estudados devido ao elevado número de atividades biológicas
5 a eles atribuídas. Essa classe de compostos é famosa pela presença de
6 substâncias que possuem acentuado efeito no sistema nervoso, sendo muitas
7 delas largamente utilizadas como venenos ou alucinógenos (Dewick, 2002).

8 São definidos como a classe de compostos orgânicos, de origem natural,
9 contendo nitrogênio em sua estrutura. Assim como outros metabolitos
10 secundários possuem um comprovado papel na defesa contra invasão de
11 microrganismos. Esta função pode ser exemplificada pelo aumento da
12 concentração de solanina em batatas quando estas são atacadas por
13 microrganismos (Henriques et al., 2002)

14 A classificação dos alcalóides é muitas vezes feita de acordo com a
15 natureza da estrutura contendo nitrogênio, como por exemplo, piperidina,
16 piperidina, quinolina, isoquinolina, indólico, e outros. De modo geral, o átomo de
17 nitrogênio presente nos alcalóides é oriundo dos aminoácidos e o anel
18 heterocíclico formado fornece a base para sua classificação química (Dewick,
19 2000).

20 Os aminoácidos protéicos comumente utilizados na biossíntese dos
21 alcalóides são: ácido L-aspartico (piridinas, isoquinoleínas), L-lisina (piperidinas,
22 quinolizidinas), L-tirosina (isoquinolinas, benzilisoquinolinas, betalaínas), L-
23 triptofano (derivados da triptamina, β -carbolinas, indóis complexos) (Figura 6) e L-
24 histidina (imidazóis). Além dos aminoácidos, outros precursores tais como
25 terpenos ou esteróides podem também ser incorporados na construção do
26 esqueleto final dos alcalóides (Henriques et al, 2004).

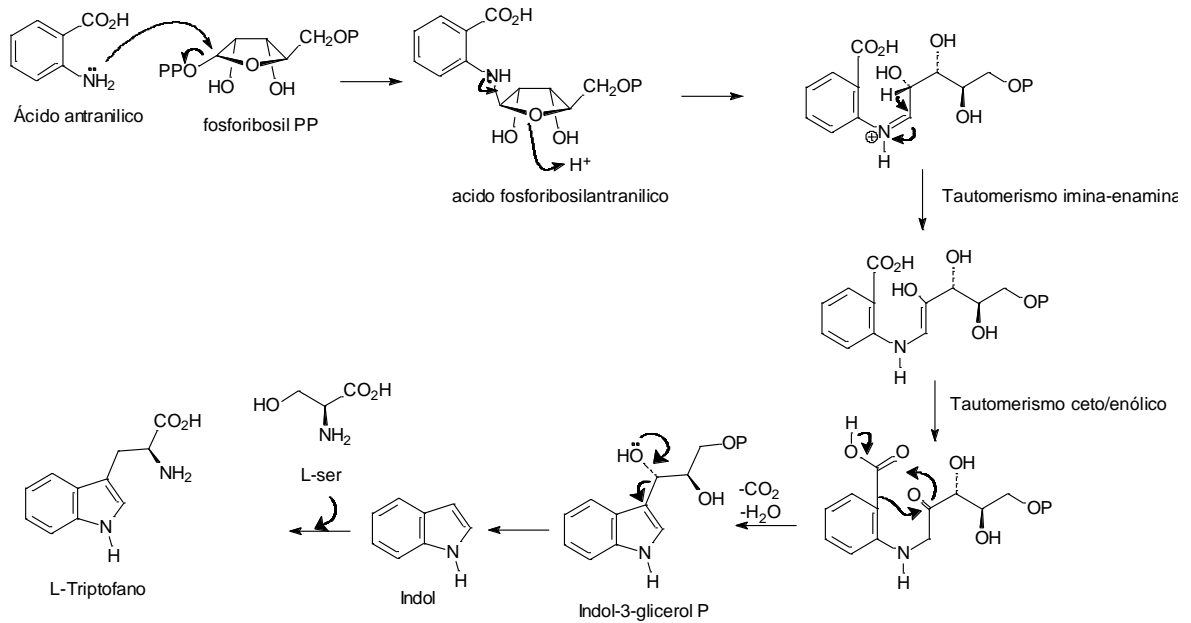


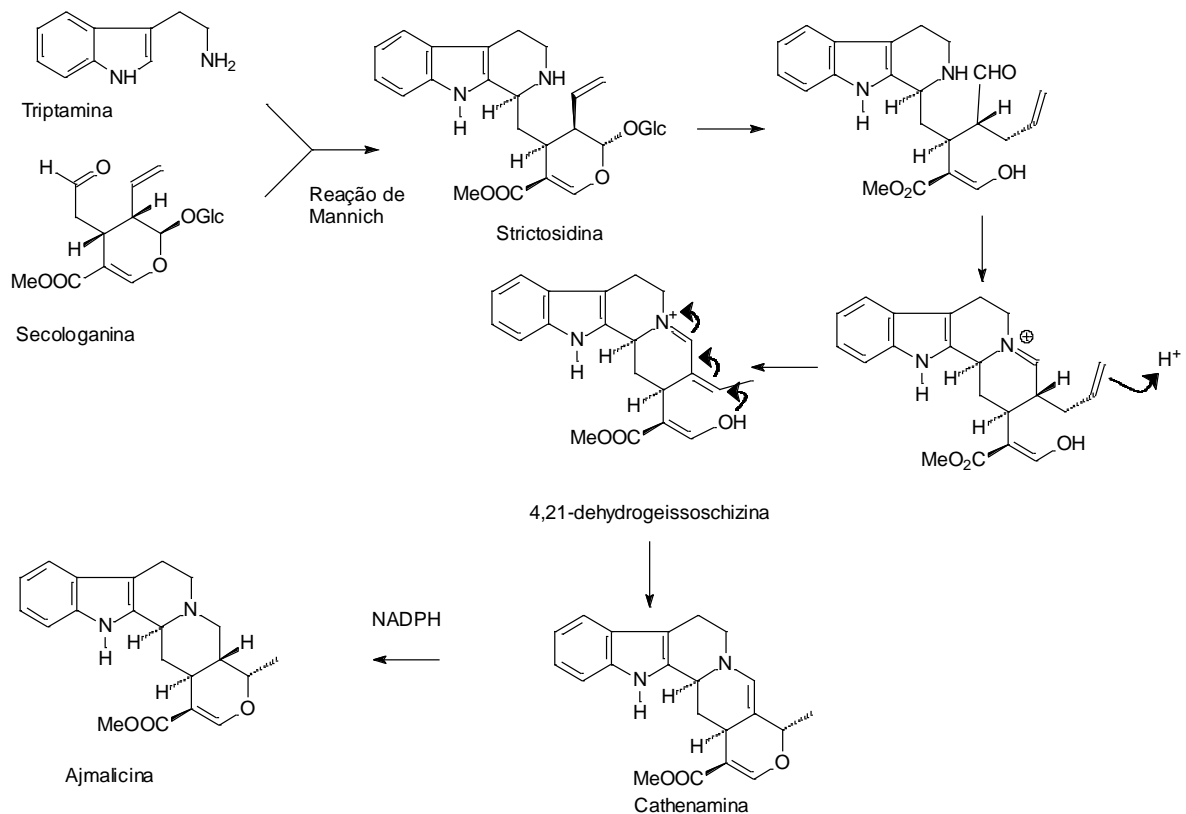
Figura 6: Formação do triptofano a partir do ácido antranílico

Os alcalóides indólicos terpenóides formam uma família de mais de 3.000 membros, dos quais apenas alguns têm efeitos fisiológicos conhecidos em mamíferos (Kutchan 1995; Geerlings et al 2000). Este tipo de alcalóide tem sido encontrado em várias famílias de plantas, mas principalmente em: Apocynaceae, Loganiaceae, Nissaceae e Rubiaceae, que são todos da ordem Gentianales (Loyola-Vargas, 2007)

A biossíntese dos alcalóides produzidos por *Catharanthus roseus* envolve a formação da secologanina, formada a partir do monoterpene pirofosfato de geranila. Secologanina é o produto final da via dos terpenóides em que o primeiro passo é a hidroxilação do geraniol a 10-hidroxigeraniol pela enzima 10-hidroxilase geraniol (G10H). Tem sido sugerido que G10H representa um local de controle para regular a biossíntese de alcalóides. Recentemente foi mostrado que secologanina deriva da rota triose fosfato via piruvato em uma suspensão de cultura de células de *Catharanthus roseus*. Triptofano descarboxilase é a enzima conversora de L-triptofano em triptamina, que está localizado na interface entre o metabolismo primário e secundário, sendo, portanto, um outro possível local de controle para regular a biossíntese do alcalóide (Contin et al, 1998). A condensação da secologanina com a triptamina produz a strictosidina, o precursor comum da rota dos alcalóides indólicos monoterpênicos. Strictosidina- β -D-glucosidase (SGD) pode ser a enzima que desempenha um papel importante

1 na condução da biossíntese dos alcalóides indólicos monoterpênicos em uma
 2 direção específica (El-Sayed e Verpoorte, 2007). A strictosidina (Figura 7), um
 3 composto intermediário, pode ser um modelo interessante para estudar o
 4 transporte vacuolar em *Catharanthus roseus*, porque este glicosídeo é sintetizado
 5 no vacúolo onde é armazenado (Roytrakul e Verpoort, 2007).

6 Muitos dos estudos experimentais que levaram a um entendimento da
 7 biossíntese de alcalóides indólicos terpenóides têm sido realizados utilizando
 8 plantas de *Catharanthus roseus*. Representantes de todas as principais classes
 9 destes alcalóides são produzidos, incluindo ajmalicina (Corynanthe), catarantina
 10 (Iboga), e vindolina (Aspidosperma).



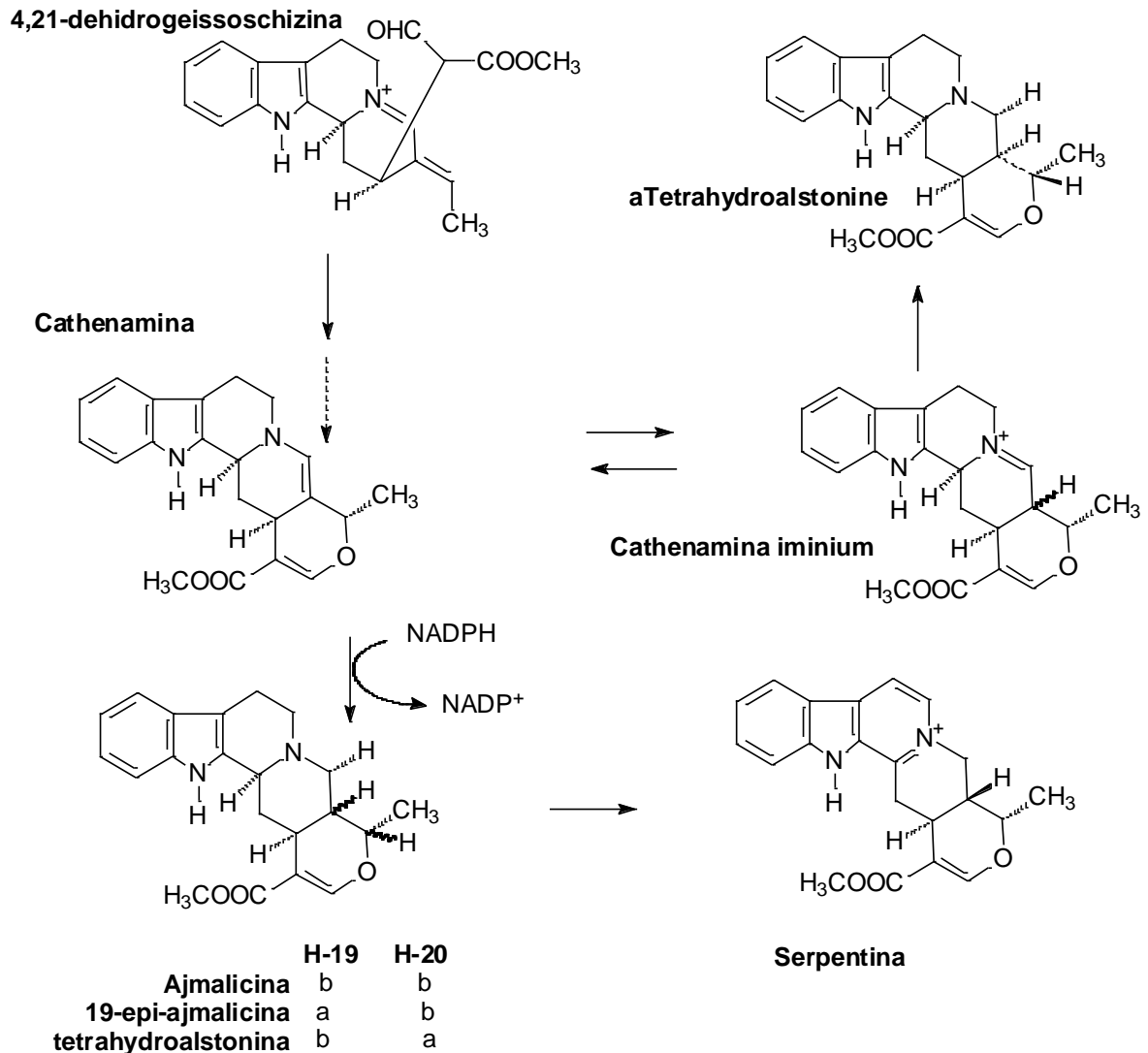
11 **Figura 7:** Rota biossintética da ajmalicina a partir da triptamina e da secologanina

12

13 A produção de ajmalicina (Figura 7) é derivada da redução da catenamina
 14 que por sua vez é produzida a partir da strictosidina. Por um mecanismo de
 15 armadilha de íon a ajmalicina é canalizada através da membrana plasmática
 16 ficando presa no vacúolo, por ter pH baixo (El-Sayed e Verpoorte, 2007).

17 Ajmalicina é ativamente transportada para vacúolos isolados contra um
 18 gradiente de concentração com um valor de K_m de $1.67\mu M$, sugerindo que este

1 alcalóide é removido de forma muito eficiente do citosol. A ajmalicina acumulada
 2 no interior do vacúolo é convertida em serpentina, e uma armadilha de íon é
 3 criada para manter o alcalóide no vacúolo (Figura 8) (Roytrakul e Verpoort, 2007).
 4



5

6 **Figura 8:** Conversão da ajmalicina em serpentina para armazenamento no
 7 vacúolo

8

9 3.3 Fungos Micorrizicos Arbusculares (FMAs)

10

11 O termo micorriza foi inicialmente proposto pelo botânico alemão Albert,
 12 Bernard Frank, em 1885, originando-se da combinação de duas palavras, sendo a
 13 primeira do Grego “mikés” que significa fungo, e a segunda do Latim “rhiza” que
 14 significa raízes, para descrever as associações mutualísticas entre as raízes da
 15 maioria das plantas vasculares e fungos do solo (Smith e Read, 1997). O tipo

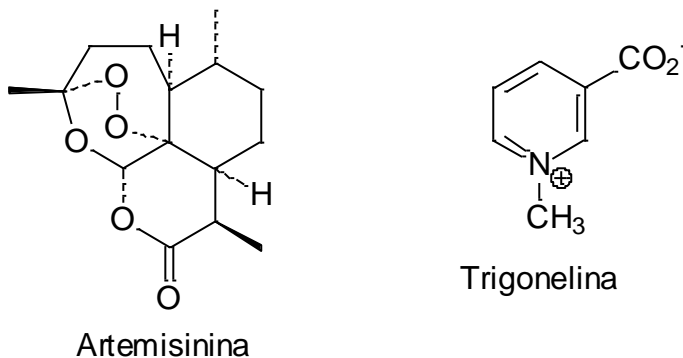
1 mais comum destas associações é a do tipo arbuscular, sendo as de maior
2 ocorrência, principalmente nas culturas de importância econômica (Jaizme-Vega
3 e Azcón, 1995, Martins et al., 2000b, Melloni et al., 2000, Nogueira e Cardoso,
4 2000, Soares e Martins, 2000).

5 A relação micorrízica é a expressão de um evento mutualístico benéfico:
6 plantas suprem o fungo com compostos contendo carbono (fixado via processo
7 fotossintético pela simbiote autotrófico), enquanto um dos principais benefícios
8 dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) à planta hospedeira está associado
9 com a absorção de nutrientes. A simbiose é possível por causa dos fungos
10 produzirem hifas intra e extra-radicular capazes de absorver elementos minerais
11 do solo e transferi-los para a raiz, onde são absorvidos. No espaço intra-radicular,
12 a troca bidirecional ocorre principalmente em um estrutura presente no córtex da
13 raiz, chamada de arbúsculo. Esses fungos aumentam a área de superfície de
14 contato com o solo, favorecendo a maior absorção de nutrientes como fósforo
15 (Bressan et al., 2001, Freitas et al, 2004, Smith e Read, 1997), nitrogênio e
16 potássio (Bressan et al, 2001, Gupta et al., 2002). Em condições controladas,
17 Marschener e Dell (1994) verificaram que os fungos micorrízicos podem ser
18 responsáveis pela absorção de cerca de 80% de P, 25% do N e 10% de K. Ryan
19 et al., (2003) identificaram teores de P, K e Mg elevados em hifas intra-radicular,
20 superiores aos encontrados nos solos ou mesmo e tecidos vegetais, confirmando
21 a capacidade dos FMAs na absorção e acumulação de nutrientes minerais.

22 Além dos efeitos nutricionais as plantas micorrizadas exibem alterações
23 metabólicas, fisiológicas e anatômicas diversas. Várias auxinas, citocininas,
24 giberelinas e vitaminas acumulam-se em maior quantidade em plantas
25 micorrizadas (Moreira e Siqueira, 2006). Torelli et al, (2000) demonstraram que
26 tanto a inoculação com micorrizas quanto as adubações com fósforo induziram o
27 acúmulo de citocininas em raízes e folhas. Shaul-Keinan et al. (2002) verificaram
28 que a simbiose micorrízica altera as concentrações de giberelina e citocinina nas
29 raízes de tabaco, tanto quantitativa como qualitativamente, sugerindo que um
30 novo equilíbrio de fitormônios da planta pode estar associado com eventos pre-
31 simbióticos. Trabalhando com suspensão de células de *Catharantus roseus*,
32 Amini et al, (2008) relataram que baixos níveis de ácido giberélico controlam a
33 biossíntese de ajmalicina.

1 Tem sido universalmente aceito que os metabólitos secundários de plantas
 2 participam ativamente na interação planta-microrganismo, especialmente na fase
 3 pré-simbiótica, onde as plantas e os fungos secretam sinais, principalmente
 4 metabólitos secundários, que são percebidos pelas raízes e induzem mudanças
 5 morfológicas e fisiológicas no micélio (Zhi-lin et al, 2007). Nos últimos anos,
 6 muitos estudos se concentraram na regulação da micorrizas por metabolitos
 7 secundários, extensas pesquisas foram realizadas para estudar o metabolismo
 8 dos terpenóides em plantas micorrizadas (Zhi-Lin et al. 2007). A biossíntese dos
 9 alcalóides produzidos por *Catharanthus roseus* envolve a formação da
 10 secologanina, formada a partir do monoterpene pirofosfato de geranila, ou seja,
 11 pode ser que plantas micorrizadas possam acumular mais alcalóides, como a
 12 ajmalicina.

13 Dentre os metabólitos secundários já foi demonstrado que os fungos
 14 micorrízicos incrementaram os teores e a qualidade (teor de mentol) dos óleos
 15 essenciais da *Mentha arvens* (Freitas et al., 2004), sesquiterpenos extraídos de
 16 raízes de trigo (Peipp et al., 1997), flavonóides extraídos de raízes de *Passiflora*
 17 *edulis* e *Trifolium repens* (Ponce et al., 2004, Soares et al., 2005), artemisinina
 18 (Figura 9) extraída de folhas de *Artemisia annua* L. (Kapoor et al, 2007). Para os
 19 compostos nitrogenados, como os alcalóides, Rojas-Andrade et al, (2003)
 20 afirmaram que o alcalóide trigonelina (Figura 9) pode ser um importante regulador
 21 durante os eventos de sinalização e da estabilização dos fungos micorrízicos
 22 arbusculares em simbiose com leguminosas. Esses autores observaram
 23 incrementos desse alcalóide nas raízes da leguminosa (*P. Laevigata*) inoculadas
 24 com *Gigaspora rosea*.



25

26 **Figura 9:** Estrutura química da artemisinina que apresenta efeito antimalárico e
 27 da trigonelina, alcalóide derivado do ácido nicotínico.

28

3.4. Adubação fosfatada x FMAs x Alcalóides

O fósforo é um componente integrante de compostos importantes das células vegetais, incluindo açúcares fosfatados, intermediário da respiração e fotossíntese, bem como fosfolipídeos que compõem as membranas. É também componente de nucleotídeos utilizados no metabolismo energético das plantas (como ATP) e no DNA e RNA (Marschner, 1995; Taiz e Zeiger, 2006).

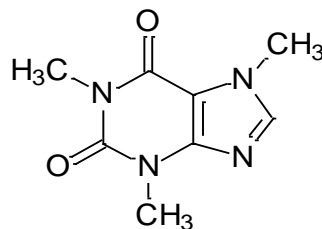
A concentração de P na maioria dos solos, principalmente nos latossolos, é geralmente baixa porque ele é rapidamente adsorvido nas superfícies dos colóides do solo ou é precipitado como fosfato de cálcio, ferro ou alumínio. O solo pode imobilizar ou fixar 200 vezes mais o P em formas não-lábeis do que plantas de cultivo anual, como a soja, que absorvem em sua massa seca (20 kg ha^{-1}). A maior parte de P no solo se move até as raízes por difusão, que geralmente é considerado um dos fatores mais limitantes à absorção de P pelas plantas (Novais et al., 2007).

Estudos indicam que a absorção dos nutrientes disponíveis nos solos é altamente favorecida com a presença de microrganismos. Com relação aos fungos micorrízicos, sabe-se que um dos principais benefícios dos fungos à planta hospedeira está associado com a absorção de nutrientes, principalmente o fósforo (Bressan et al., 2001, Freitas et al, 2004, Smith e Read, 1997). O fósforo regula o desenvolvimento da micorriza, sendo que várias hipóteses já foram propostas para explicar essa regulação. O fósforo pode afetar a exudação radicular, cujos componentes podem ser importantes para a nutrição dos fungos micorrízicos arbusculares, ou, sinalização molecular durante os processos de pré-infecção e colonização (Kiriacheck et al., 2009). Geralmente os maiores benefícios da inoculação com FMAs ocorrem em doses baixas de P no solo. A aplicação elevada deste elemento causa aumento nos custos de produção e pode inibir a atuação dos fungos micorrízicos (Kiriachek et al., 2009, Smith e read, 1997), pois os benefícios das associações micorrízicas são inibidas em condições de elevada fertilidade e favorecida pela baixa fertilidade.

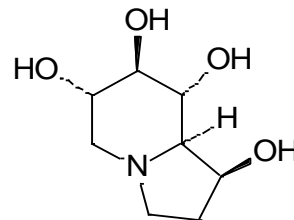
A deficiência ou excesso de nutrientes podem causar um incremento ou redução na produção de metabólito secundário de plantas. Segundo Martins et al. (2000), o fósforo contribui para o aumento da concentração de alcalóides na

1 beladona (*Atropa belladonna*). Na deficiência de fósforo o efeito mais negativo é a
 2 redução da produção de biomassa, reduzindo a produção total de alcalóides.
 3 Gershenzon (1984) relata em sua revisão que os efeitos da adição de fósforo na
 4 biossíntese de alcaloides são variáveis. Mazzafera, (1999) estudando o efeito do
 5 suprimento dos nutrientes sobre o teor de cafeína (Figura 10) em folhas de café
 6 (*Coffea arábica* L.), observou que na ausência de fósforo, houve redução no teor
 7 de cafeína.

8 Abu-Zeyad et al (1999) realizaram experimento com *Castanospermum*
 9 *australe*, inoculadas com *Glomus intraradices* e *Gigaspora margarita* e adubadas
 10 com fósforo, e observaram que os fungos micorrizicos arbusculares
 11 proporcionaram incrementos no crescimento e nos teores de P e
 12 castanospermina (Figura 10) nas folhas, independentemente da adubação
 13 fosfatada. Não foi encontrada correlação entre o teor do alcalóide das folhas das
 14 plantas micorrizadas e não micorrizadas que receberam P. Nenhuma diferença
 15 significativa na produção de castanospermina foi encontrada entre os tratamentos
 16 adubados com P, quando a espécie de FMA, *Gigaspora margarita*, foi utilizado
 17 como inóculo.



Cafeína



Castanospermina

18

19 **Figura 10:** Alcalóides que tiveram seus teores avaliados em estudos com
 20 adubação fosfatada.

21

22 3.5. Adubação nitrogenada x FMAs x Alcalóides

23

24 Normalmente, o nitrogênio representa o nutriente mais exigido pelas
 25 culturas, uma vez que participa da estrutura molecular de aminoácidos, ácidos
 26 nucléicos, pigmentos e metabólicos secundários, como os alcaloides (Marschner,
 27 1995; Taiz e Zeiger, 2006). Portanto, a deficiência desse nutriente rapidamente
 28 inibe o crescimento vegetal.

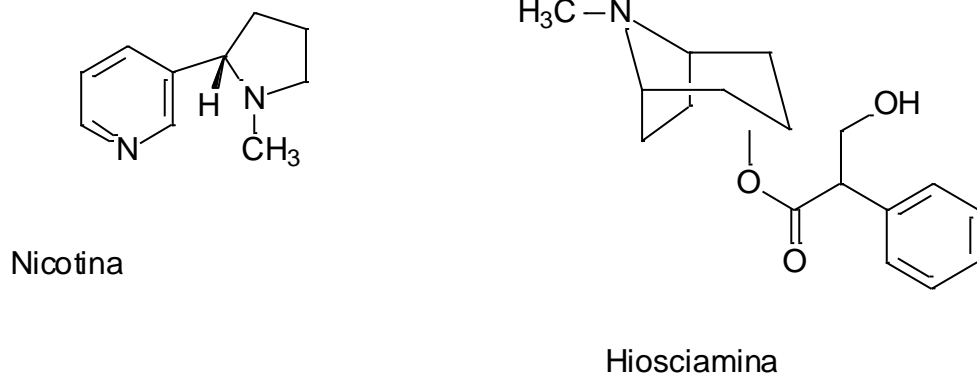
1 Uma grande quantidade de N está armazenada na matéria orgânica do
2 solo, mas as plantas geralmente absorvem nas formas inorgânicas (NH_4^+ e NO_3^-).
3 Os fungos micorrizas arbusculares podem aumentar o acesso as fontes de N
4 orgânico (Hodge et al., 2001, Atul-Nayyar et al., 2009). A translocação pelo fungo
5 pode representar um incremento significativo na absorção de N pela planta, como
6 mostrado por Toussaint et al (2004). Esses autores demonstraram *in vitro* que
7 pelo menos 21% de N absorvido pelas raízes vieram do micélio fúngico extra
8 radicular das micorrizas. Tanaka e Yano (2005) observaram que 75% do
9 nitrogênio em folhas de milho foram provenientes do micélio fúngico extra
10 radicular da espécie *Glomus aggregatum*.

11 Um dos efeitos dos fungos micorrízicos no metabolismo das plantas é a
12 alteração na composição dos aminoácidos (Moreira e Siqueira, 2006). Nesse
13 sentido, Takahashi (2001) observou alterações nos perfis de aminoácidos na
14 parte aérea de plantas de tabaco inoculadas com fungos micorrízicos, em relação
15 a plantas não micorrizadas e concluiu que os fungos micorrízicos podem alterar o
16 metabolismo de N nas plantas. Esse autor verificou que aminoácidos como serina
17 foram incrementados na parte aérea, quando as plantas de tabaco foram
18 cultivadas com 150 mg N na forma de uréia e inoculado com a espécie *Glomus*
19 *clarum* e que nesse mesmo tratamento, também ocorreu as maiores
20 porcentagens de colonização micorrízica. Sabemos que a serina é um dos
21 substratos para formação do triptofano. Na biossíntese da ajmalicina, um dos
22 precursores é a triptamina, precursor do triptofano.

23 Os alcalóides, metabólitos secundários que possuem um átomo de
24 nitrogênio em sua estrutura, podem ser suscetíveis a variações de seus teores a
25 adubações com nitrogênio. O incremento desse nutriente aumenta a
26 concentração dos alcalóides na maioria das espécies estudadas. Entretanto, esse
27 efeito na biossíntese vai depender em parte da origem das rotas biossintéticas
28 desses alcalóides e do tipo de ambiente com as quais essas plantas estão
29 adaptadas (Gershenzon, 1984). Lou e Baldwin (2004), avaliando o efeito do
30 suprimento de nitrogênio na biossíntese de três metabólitos secundários (nicotina,
31 tripsina e cafeoilputrecina) encontrados em plantas de *Nicotiana attenuata*,
32 observaram que os teores de nicotina (Figura 11) e tripsina foram maiores nas
33 plantas bem supridas com N, porém não foi observado esse incremento para o

1 composto cafeoilputrecina. Em raízes de *Atropa belladonna*, Baričević e Zupančič
 2 (2002) verificaram que o máximo teor do alcalóide tropânico, hiosciamina (Figura
 3 11), ocorreu quando essas plantas foram submetidas a maior dose de nitrogênio
 4 utilizada no experimento.

5 Avaliando os teores de alcalóides em folhas e raízes de genótipos de vinca
 6 cultivados em doses crescentes de nitrogênio, Sreevalli et al., (2004) concluíram
 7 que a adubação nitrogenada proporcionou incrementos significativos nos teores
 8 de alcaloides, tanto nas folhas quanto nas raízes de todos os genótipos
 9 estudados. Na maior dose de N estudada (150 kg ha^{-1}) os incrementos foram de
 10 42 e 32% de alcaloides nas folhas e raízes, respectivamente.



11
 12 **Figura 11:** Alcalóides que tiveram seus teores aumentados em plantas
 13 submetidas à adubação nitrogenada

14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26
 27

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

4. ARTIGO Nº 1

Bioprodução de Ajmalicina em *Catharanthus roseus* (L.) G. Don Inoculadas com Fungos Micorrízicos Arbusculares e Adubadas com Nitrogênio

Resumo - *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (perivca Madgaskar) da família Apocynaceace é cultivado em regiões tropicais e subtropicais do mundo. A planta produz vários alcalóides farmacologicamente importantes sendo a ajmalicina e serpentina usadas no tratamento de doenças circulatórias. Com o objetivo de avaliar os efeitos de diferentes espécies de Fungos Micorrizas Arbusculares sobre o crescimento, composição mineral e teores de ajmalicina em raízes de *Catharanthus roseus* (L.) G. DON, cultivada em diferentes doses de nitrogênio, montou-se um experimento em casa de vegetação. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados em arranjo fatorial 4 x 4, sendo três tratamentos microbiológicos [*Glomus etunicatum*, *Glomus intraradices*, inóculo misto (*Glomus clarum* e *Gigaspora margarita*)] e sem fungo e quatro doses de nitrogênio (15, 30, 60 e 120 mg Kg⁻¹ de solo), com quatro repetições. A unidade experimental foi composta por um vaso contendo 4 kg de substrato e quatro plantas por vaso. As plantas foram colhidas com 90 dias após o plantio, em pleno florescimento. Determinou-se a altura, número de folhas, massa seca da parte aérea e raiz, porcentagem de colonização micorrízica nas raízes, teores de N, P, K, Ca, Mg e ajmalicina nas raízes. Os resultados demonstram que plantas conhecidas como vinca inoculadas com inóculo misto e *G. etunicatum* apresentaram maiores crescimentos e maiores teores de P na massa seca da parte aérea independente da dose de N utilizada. Os maiores teores de ajmalicina

1 foram obtidos em raízes de vinca nos tratamentos inoculados com inóculo misto e
2 *G. etunicatum* associado com a aplicação de 60 mg de N por Kg de solo.

3

4 **Termos para indexação:** Alcaloides, Apocynaceae, *Glomus etunicatum*, *Glomus*
5 *intraradices*

6

7

8 **Abstract** - The ajmalicina is an indole alkaloid found in large quantities in roots of
9 *Catharanthus roseus* (L) G. Don. The plant produces several pharmaceutically
10 important alkaloids: serpentine and ajmalicine being used in the treatment of
11 circulatory diseases. In order to evaluate the effects of different AMF species on
12 growth, mineral composition and content of alkaloids in *Catharanthus roseus* (L.)
13 G. DON roots, grown in different nitrogen levels, an experiment was set up in a
14 greenhouse. The experimental design was randomized blocks in 4 x 4 factorial
15 arrangement, with three treatments microbiological [*Glomus etunicatum*, *Glomus*
16 *intraradices*, mixed inoculum (*Glomus clarum* and *Gigaspora margarita*)] and
17 without fungi and four nitrogen levels (15, 30, 60 and 120 mg kg⁻¹ soil), with four
18 replications. The experimental unit consisted of one pot containing 4 kg of
19 substrate and four plants per pot. Plants were harvested 90 days after planting in
20 full bloom. It was determined the height, leaf number, dry mass of shoot and root,
21 percentage of mycorrhizal colonization in the roots, N, P, K, Ca, Mg and
22 ajmalicine. The results demonstrate that vinca plants inoculated with mixed
23 inoculums and *G. etunicatum* showed higher growth and increased levels of P in
24 shoot dry mass independent of N dose. The greatest concentration of ajmalicine
25 were obtained in roots of vinca in treatments inoculated with mixed inoculums and
26 *G. etunicatum* associated with the application of 60 mg N per kg soil.

27

28 **Key words:** Alkaloids, Apocynaceae, *Glomus etunicatum*, *Glomus intraradices*

29

30

31

32

33

34

35

Introdução

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

As plantas, além de serem usadas na medicina popular para fins terapêuticos são importantes para a obtenção de várias drogas, até agora amplamente utilizados em clínicas, tais como ajmalicina, morfina, colchicina emetina, vincristina e rutina. Embora muitos desses compostos podem ser sintetizados em laboratório, esta síntese é tão complexa que os rendimentos são baixos e a produção economicamente inviável. Entre as diversas espécies de plantas, na espécie *Catharanthus roseus* G. Don L. foram identificados mais de 130 alcalóides, muitos dos quais têm importante aplicação farmacêutica, como a ajmalicina, encontrada nas raízes, e usada como um anti-hipertensivo (Kulkarni et al., 2004 , Sottomayor et al., 2004).

A disponibilidade de nitrogênio muitas vezes limita o crescimento das plantas. Uma grande quantidade de N é armazenada na matéria orgânica do solo, mas as plantas geralmente absorvem nas formas inorgânicas (NH_4^+ e NO_3^-). Os fungos micorrizas arbusculares podem aumentar o acesso a fontes de N orgânico (Hodge et al., 2001, Atul-Nayyar et al., 2009). A translocação pelo fungo pode representar um incremento significativo na absorção de N pela planta, como mostrado por Toussaint et al (2004). Esses autores demonstraram, *in vitro*, que pelo menos 21% de N absorvido pelas raízes vieram do micélio fúngico extra radicular das micorrizas. Tanaka e Yano (2005) observaram que 75% do nitrogênio em folhas de milho foram provenientes do micélio fungico extra radicular da espécie *Glomus aggregatum*.

Um dos efeitos dos fungos micorrízicos no metabolismo das plantas é a alteração na composição dos aminoácidos (Moreira e Siqueira, 2006). Nesse sentido, Takahashi (2001) observou alterações nos perfis de aminoácidos na parte aérea de plantas de tabaco inoculadas com fungos micorrízicos, em relação a plantas não micorrizadas e concluiu que os fungos micorrízicos podem alterar o metabolismo de N nas plantas. Esse autor verificou que, aminoácidos como serina foram incrementados, quando as plantas de tabaco foram cultivadas com 150 mg kg de uréia e inoculado com a espécie *Glomus clarum* e que nesse mesmo tratamento, também ocorreu as maiores porcentagens de colonização micorrízica. Sabemos que a serina é um dos substratos para formação do

1 triptofano. Na biossíntese da ajmalicina, um dos precursores é a triptamina, que
2 está quimicamente relacionado ao aminoácido triptofano (Dewick, 1997).

3 A biossíntese de metabólitos secundários e, conseqüentemente, dos
4 compostos bioativos em plantas depende de fatores genéticos, fisiológicos e
5 ambientais. A estratégia para aumentar a bioprodução desses compostos seria o
6 cultivo, levando em conta também, fatores ambientais. Dentro dos fatores
7 ambientais a inoculação com fungos micorrízicos (Rojas-Andrade et al, 2003;
8 Abu-Zeyad et al, 1999) ou adubação com nitrogênio (Sreevalli et al., 2004; Lou e
9 Baldwin, 2004) já foram mencionados como fatores importantes para a produção
10 de alcaloides. No entanto, para *Catharanthus roseus* G. Don L, não se sabe a
11 influência de fungos micorrízicos em conjunto com adubação nitrogenada na
12 bioprodução de ajmalicina nas raízes. Neste contexto, o presente estudo tem
13 como objetivos avaliar os efeitos de diferentes espécies de FMAs sobre o
14 crescimento, composição mineral, teores e conteúdos de ajmalicina em raízes de
15 *Cathranthus roseus* (L.) G. Don, cultivadas em diferentes doses de N.

16 17 **Material e Métodos**

18 19 *Local e delineamento experimental*

20
21 O experimento foi realizado em casa de vegetação na Universidade
22 Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, localizada em Campos dos
23 Goytacazes, RJ (latitude = 21°19'23"; longitude = 41°10'40"; altitude = 14m).

24 O delineamento experimental adotado foi o de blocos casualizados em
25 arranjo fatorial 4 x 4, sendo 3 tratamentos microbiológicos [*Glomus etunicatum*
26 (Becker & Gerdeman); *Glomus intraradices* (Schenck & Smith); inóculo misto
27 (*Glomus clarum* Nicolson & Schenck e *Gigaspora margarita* Becker & Hall) e sem
28 fungo] e 4 doses de nitrogênio (15, 30, 60 e 120 mg kg⁻¹ de solo), com 4
29 repetições. A unidade experimental foi composta por um vaso plástico contendo 4
30 kg de substrato e quatro plantas por vaso.

31

32

33

1 *Características do substrato*

2

3 O substrato utilizado para o experimento foi classificado como Cambissolo
4 Háplico tb distrófico típico, coletado na profundidade de 0-20 cm, peneirado,
5 misturado com areia e posteriormente esterilizado em autoclave por 2 vezes, a
6 uma temperatura de 121°C por 1 hora, com a finalidade de eliminar os FMAs
7 nativos. Após a autoclavagem, o substrato apresentou as seguintes
8 características químicas: pH em água = 6,5; matéria orgânica = 7,24 g dm⁻³, P =
9 12,0 mg dm⁻³; S = 14,0 mg dm⁻³; K⁺ = 0,7 mmol_c dm⁻³; Ca⁺² = 16,7 mmol_c dm⁻³;
10 Mg⁺² = 10,7 mmol_c dm⁻³; Al⁺³ = 0,0 mmol_c dm⁻³; H+Al = 1,3 mmol_c dm⁻³; SB = 28,6
11 mmol_c dm⁻³; T = 29,90 mmol_c dm⁻³; Fe = 39,90 mg dm⁻³; Cu = 0,47 mg dm⁻³; Zn =
12 1,92 mg dm⁻³; Mn = 108,9 mg dm⁻³ e B = 0,73 mg dm⁻³.

13

14 *Preparo dos inóculos de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs)*

15

16 O substrato utilizado na multiplicação do inóculo foi uma mistura de solo e
17 areia na proporção de 1:2 (v/v), esterilizado em autoclave por duas vezes, a
18 121°C, por uma hora. Ao substrato, colocado em vasos com capacidade de 3 Kg,
19 foram adicionados 50 g de inóculo inicial, constituindo uma mistura de solo
20 contendo esporos, hifas e raízes colonizadas, com o fungo de cada espécie a ser
21 estudada: *Glomus clarum*, *Gigaspora margarita*, *Glomus intraradices* e *Glomus*
22 *etunicatum*. O inóculo inicial dos fungos foi obtido da coleção do Setor de
23 Microbiologia do Solo da UENF. Em seguida, 15 sementes de *Brachiaria*
24 *brizantha*, desinfectadas com solução 0,5% de hipoclorito de sódio durante 10 min
25 e lavadas com água deionizada, foram semeadas em cada vaso. Quatro meses
26 após a semeadura, a parte aérea foi cortada e trinta dias após o corte, a mistura
27 de solo contendo esporos, hifas e raízes finas cortadas, foi utilizada como inóculo.

28

29 *Propagação e inoculação da Vinca*

30

31 Foram utilizadas sementes da vinca rósea, fórmula mix da Susntorm.
32 Foram plantadas 20 sementes por vaso. Antes de semear foram adicionados 50 g
33 do inóculo das espécies FMAs estudadas deixando o tratamento controle sem

1 inoculação. Os inóculos foram colocados 2-3 cm abaixo da superfície do solo. As
2 plantas foram irrigadas diariamente, utilizando-se água deionizada.

3 Aos 20 dias, após o plantio, foi feito o primeiro desbaste, permanecendo 10
4 plantas mais vigorosas em cada vaso, e aos 40 dias o segundo desbaste,
5 deixando 4 plantas por vaso.

6

7 *Colheita e variáveis analisadas*

8

9 As plantas foram colhidas noventa dias após o plantio, e determinou-se a
10 altura, número de folhas, massa seca da parte aérea e raiz, porcentagem de
11 colonização micorrízica nas raízes, teores de N, P, K, Ca e Mg e teores de
12 ajmalicina nas raízes.

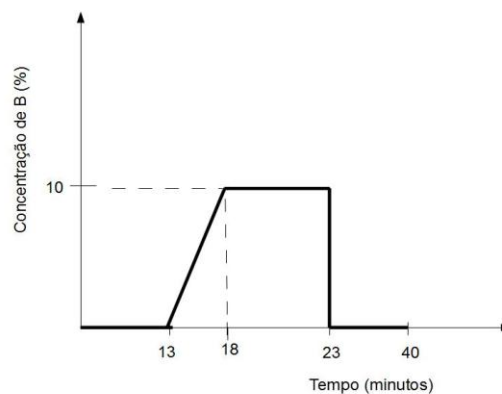
13 A medição da altura foi realizada com o auxílio de uma régua milimetrada.
14 A parte aérea foi seca em estufa de ventilação forçada, a uma temperatura de
15 40°C por 5 dias, após esse período foi determinada massa seca foliar e das
16 raízes.

17 As raízes finas foram coletadas, lavadas com água, cortadas em
18 aproximadamente 2 cm de comprimento e armazenadas em álcool etílico 50%
19 para posterior avaliação da porcentagem de colonização radicular. Para
20 determinar a porcentagem de colonização micorrízica, as raízes foram coloridas
21 segundo Grace e Stribley (1991), com as seguintes adaptações, KOH 5% a 80°C.
22 As raízes foram levadas ao microscópio para observação da presença de
23 estruturas de FMAs.

24 A parte aérea seca e as raízes secas foram moídas em moinho do tipo
25 Willey e armazenadas em frasco hermeticamente fechado. Nas raízes foram
26 determinados os teores de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e
27 magnésio (Mg), para isso o material vegetal foi submetido à oxidação pela
28 digestão sulfúrica, obtendo-se o extrato, no qual se determinou o nitrogênio pelo
29 método de Nessler (Jackson, 1965), o fósforo pelo método colorimétrico do
30 molibdato, o potássio por espectrofotometria de emissão de chama e o cálcio e
31 magnésio por absorção atômica (Malavolta et al., 1997).

32 A extração da ajmalicina nas raízes foi realizada a partir de 10 mg de
33 raízes, 1 mL de H₃PO₄, 0,25M. O material foi submetido a homogeneização, e

1 posteriormente, centrifugado por 30 minutos a 14000 g. Em seguida, o material foi
2 submetido ao banho ultrassônico por 30 minutos, conforme metodologia de
3 Hallard (2000). A determinação da ajmalicina foi realizada por cromatografia
4 líquida de alta eficiência, usando aparelho da marca Shimadzu, equipado com
5 uma coluna C18 “Low TFA” utilizando detector de PDA. As condições
6 cromatográficas foram as seguintes: fluxo de $0,5 \text{ ml min}^{-1}$, fase móvel constituída
7 por solvente A (água, acetonitrila e ácido trifluoroacético nas concentrações 79:
8 21:0,01) e solvente B (água, acetonitrila e ácido trifluoroacético nas
9 concentrações 5: 95: 0,01), com gradiente de eluição descrito na Figura 1.



10 Figura 1: Gradiente de eluição da fase móvel

11

12 Para a análise quantitativa da ajmalicina utilizou-se o método do padrão
13 externo, empregando ajmalicina como referência. Os pontos da curva padrão
14 foram: 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1 mg mL^{-1} para ajmalicina. As soluções foram
15 preparadas em H_3PO_4 , e injetadas nas mesmas condições das amostras. O
16 comprimento de onda utilizado foi de 254 nm.

17 Com as áreas obtidas nos cromatogramas para cada concentração definida
18 dos padrões foram montadas as equações do tipo $y = a + bx$, onde $y =$
19 concentração e $x =$ área. As áreas das amostras foram introduzidas nessa
20 equação e obtidas as respectivas concentrações em mg mL^{-1} para se obter a
21 concentração de ajmalicina.

22

23

1 *Análise estatística*

2

3 Os dados foram submetidos à análise de variância. Para os dados
4 quantitativos, como o fator dose de N, foi utilizada análise de regressão
5 polinomial, teste F da análise de variância da regressão e coeficientes do modelo
6 estatisticamente significativo e maior R^2 . Para os dados qualitativos, no caso do
7 fator tratamentos microbiológicos, foi utilizado o teste de Tukey a 5% de
8 probabilidade.

9

10

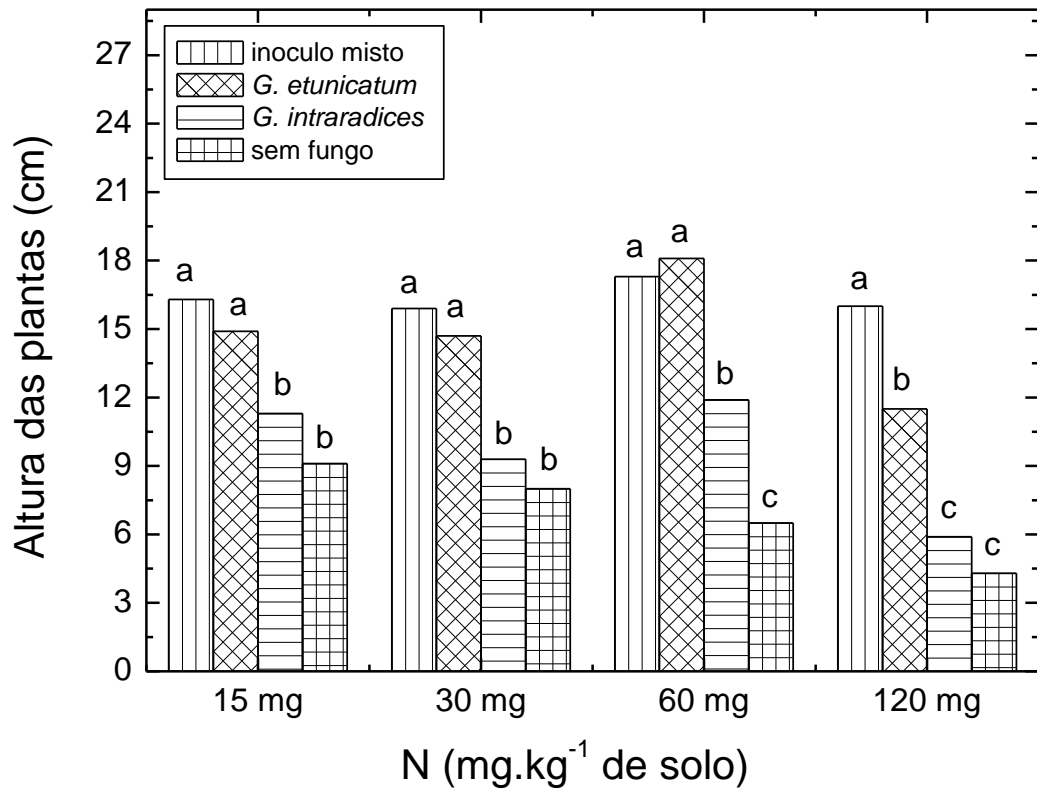
11

12

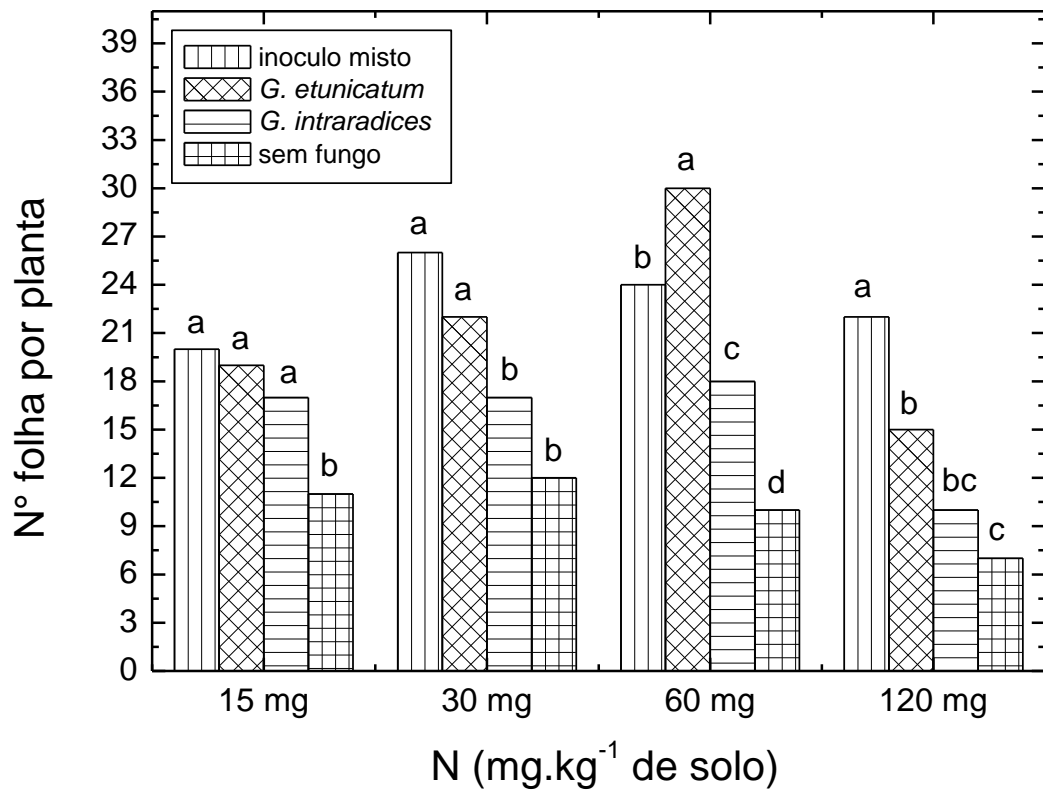
Resultados e Discussão

13

14 Verificou-se efeito da interação entre as espécies de fungos e doses de N
15 para as variáveis altura e número de folhas da vinca (Figuras 2 e 3 e Tabela 1).
16 Em todas as doses de N estudadas os tratamentos inoculados com inoculo misto
17 e *Glomus etunicatum* proporcionaram incrementos na altura e número de folha da
18 vinca. Esses incrementos variaram de 79% e 63%, respectivamente, na menor
19 dose de N (15 mg kg⁻¹ de solo) e 272% e 167%, respectivamente, na maior dose
20 de N (120 mg kg⁻¹ de solo) em relação ao tratamento sem fungo. Os maiores
21 incrementos na altura (166%, 178% e 83% nos tratamentos com inóculo misto, *G.*
22 *etunicatum* e *G. intraradices*) foram obtidos na dose de 60 mg N kg⁻¹ de solo em
23 relação ao tratamento sem fungo (Figura 2). Para a variável número de folhas, os
24 incrementos variaram de 81 e 72%, respectivamente, para a menor dose e 214 e
25 114% para a maior dose de N, em relação ao tratamento sem fungo (Figura 3).
26 Esses resultados demonstram a eficiência destas espécies de fungo em promover
27 o crescimento das plantas de vinca em todas as doses de N estudadas. Diniz
28 (2007) verificou um maior incremento no crescimento de mudas de seringueira
29 inoculadas com *Glomus clarum* comparado às plantas não inoculadas.



1
 2 **Figura 2:** Altura (cm) da vinca aos noventa dias após o plantio em função dos
 3 tratamentos microbiológicos e das doses de nitrogênio. Médias
 4 seguidas pela mesma letra no bloco não diferem entre si, pelo teste de
 5 tukey, ao nível de significância de 5%.
 6



1
2 **Figura 3:** Número de folhas da vinca aos noventa dias após o plantio em função
3 dos tratamentos microbiológicos e das doses de nitrogênio. Médias
4 seguidas pela mesma letra no bloco não diferem entre si, pelo teste de
5 tukey, ao nível de significância de 5%.
6

7 **Tabela 1.** Equações de regressão para altura de plantas e número de folhas da
8 vinca para doses de nitrogênio em função de tratamentos microbiológicos

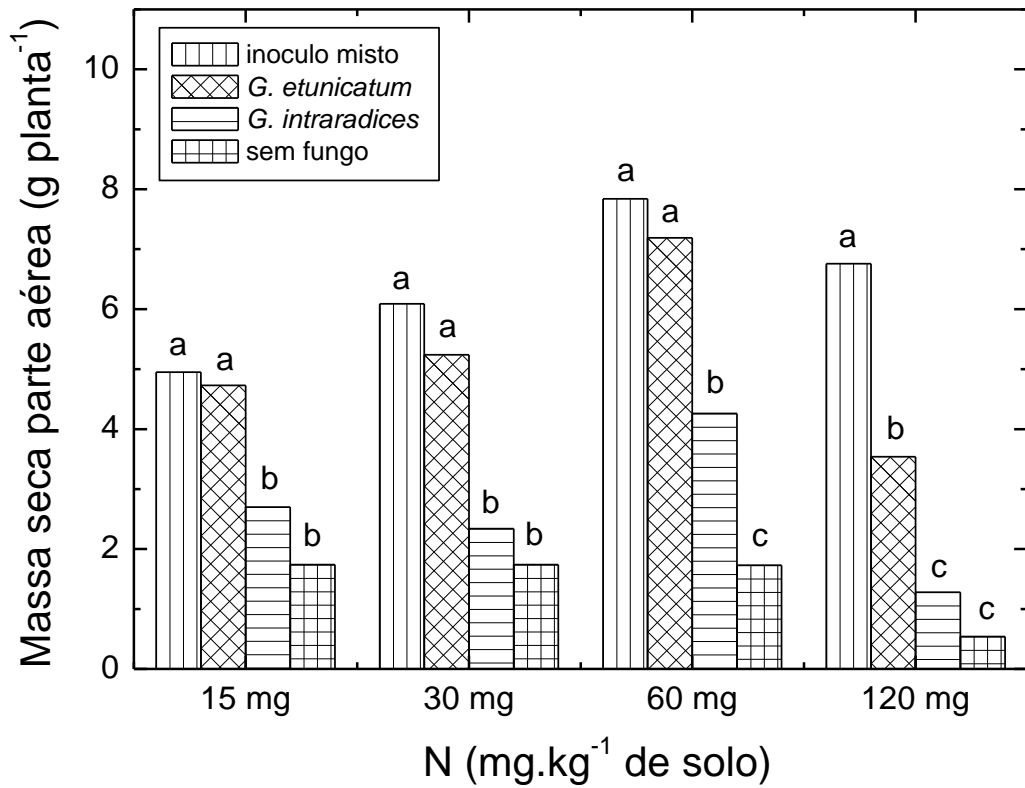
Parâmetro avaliado	Tratamentos microbiológicos	Equações	R ²
Altura de plantas (cm)	Inoculo misto	$Y = 16,4$	
	<i>G. etunicatum</i>	$Y = 11,61 + 0,1965x - 0,001641x^2$	0,88**
	<i>G. intraradices</i>	$Y = 9,276 + 0,08749x - 0,000961x^2$	0,78**
	Sem fungo	$Y = 9,5163 - 0,04478x$	0,98**
N° folha por planta	Inoculo misto	$Y = 18,62 + 0,1891x - 0,001388x^2$	0,50*
	<i>G. etunicatum</i>	$Y = 9,583 + 0,6108x - 0,004707x^2$	0,97**
	<i>G. intraradices</i>	$Y = 13,95 + 0,1614x - 0,001615x^2$	0,97*
	Sem fungo	$Y = 12,239 - 0,042029x$	0,93*

1 Para as doses de N, estimaram-se, em todos os tratamentos
2 microbiológicos, funções quadráticas e lineares para a altura e número de folhas
3 (Tabela 1). A maior altura foi obtida quando se utilizou 59,8 g kg⁻¹ de N para o
4 tratamento inoculado com *Glomus etunicatum*, estimado em 18 cm. As doses de
5 N estudadas não influenciaram a altura das plantas de vinca quando inoculadas
6 com inóculo misto, com média de 16,4 cm de altura, sendo superiores às plantas
7 não inoculadas.

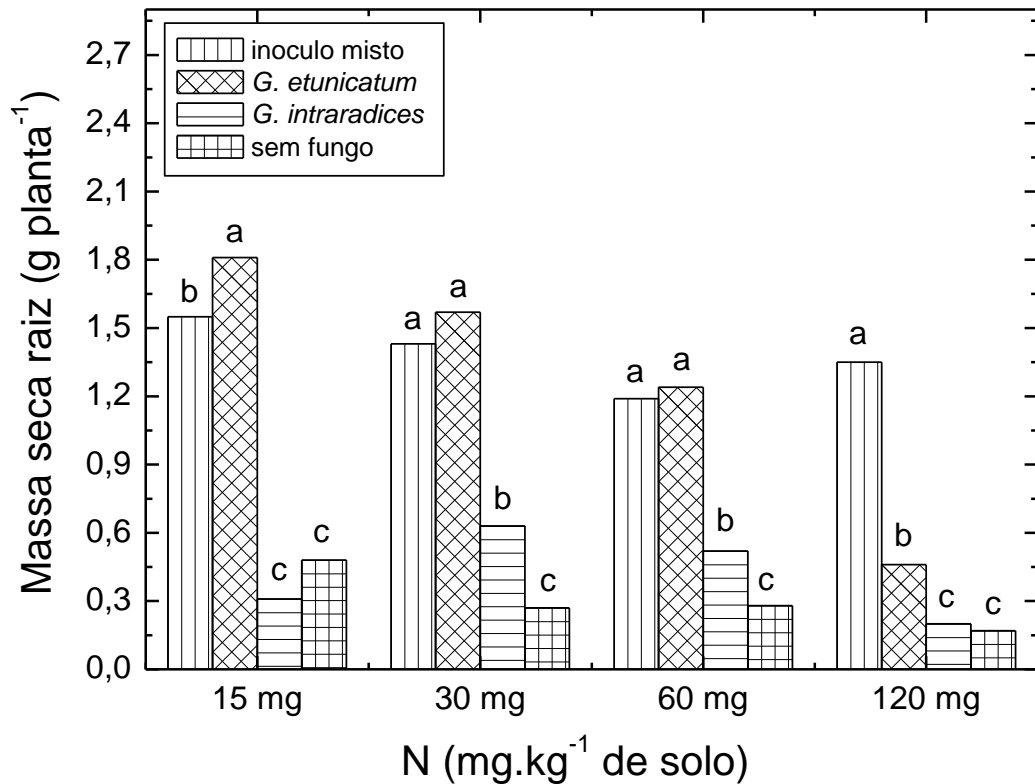
8 Para a variável número de folhas observou-se que em todas as doses de N
9 estudadas plantas com o inóculo misto e *Glomus etunicatum* apresentaram
10 quantidades superiores às plantas não inoculadas. Sendo que o maior número de
11 folhas (30 folhas por planta) foi obtido na dose de 60 mg em plantas inoculadas
12 com *Glomus etunicatum*.

13 Nas Figuras 4 e 5 observa-se que em todas as doses de N estudadas a
14 inoculação das plantas de vinca com o inoculo misto e *G. etunicatum*
15 proporcionaram incrementos na massa seca da parte aérea e da raiz. Para a
16 massa seca da parte aérea, na menor dose de N o incremento foi de 184% para
17 as plantas inoculadas com misto e 172% para *G. etunicatum* e na maior dose de
18 N foi de 1151 e 555%, respectivamente, em relação ao tratamento sem fungo
19 (Figura 4). Na massa seca da raiz esses incrementos foram de 222 e 277 % em
20 plantas inoculadas com misto e *G. etunicatum*, respectivamente, na menor dose
21 de N e na maior dose de N de 694 e 170%, respectivamente (Figura 5).

22



1
 2 **Figura 4.** Massa seca da parte aérea da vinca em função da inoculação com
 3 FMAs e da adubação nitrogenada. Médias seguidas pela mesma letra
 4 no bloco não diferem entre si, pelo teste de tukey, ao nível de
 5 significância de 5%.
 6



1

2 **Figura 5.** Massa seca da raiz da vinca em função da inoculação com FMAs e da
 3 adubação nitrogenada. Médias seguidas pela mesma letra no bloco
 4 não diferem entre si, pelo teste de tukey, ao nível de significância de
 5 5%.

6

7

8 Verificou-se nas plantas inoculadas regressão quadrática para a produção
 9 de massa seca da parte aérea e da raiz e nas plantas não inoculadas regressão
 10 linear (Tabela 2). O aumento na dose de N provocou decréscimo na produção de
 11 massa seca da parte aérea e da raiz em plantas não inoculadas. Esses resultados
 12 sugerem que apesar de ter ocorrido um decréscimo na massa seca da raiz e que
 13 pode ser consequência do estresse por excesso de N no solo, a planta produziu
 14 maiores teores de ajmalicina para minimizar os efeitos de grandes quantidades de
 15 N presentes no solo. As maiores produções de massa seca da parte aérea foram
 16 obtidas com doses de N estimadas em 79, 64, 62 mg kg⁻¹ de solo, para os
 17 tratamentos com inoculo misto, *G. etunicatum* e *G. intraradices*, respectivamente.

17

18

19

1 **Tabela 2.** Equações de regressão para massa seca da parte aérea e da raiz da
 2 vinca para doses de nitrogênio em função de tratamentos
 3 microbiológicos
 4

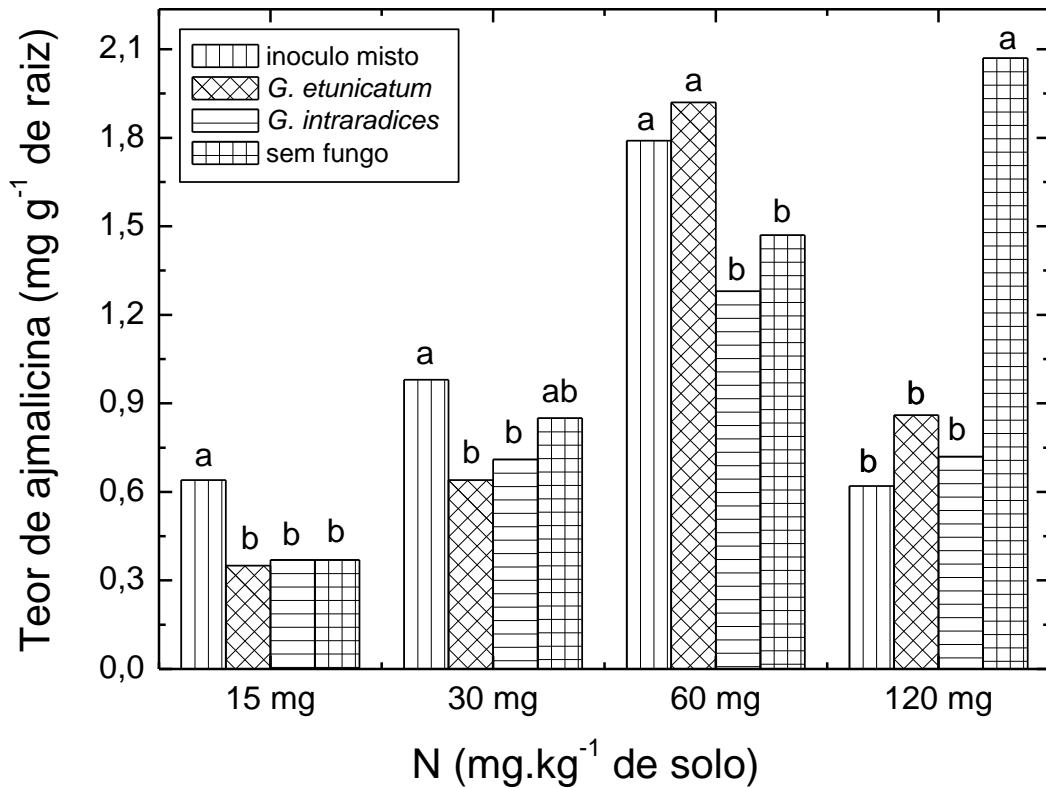
Parâmetro avaliado	Tratamentos microbiológicos	Equações	R ²
Massa seca da parte aérea (g)	Inoculo misto	$Y = 3,219 + 0,12278x - 0,000776x^2$	0,99**
	<i>G. etunicatum</i>	$Y = 2,650 + 0,13527x - 0,001062x^2$	0,94**
	<i>G. intraradices</i>	$Y = 1,049 + 0,09152x - 0,000742x^2$	0,78**
	Sem fungo	$Y = 2,106 - 0,01181x$	0,84**
Massa seca raiz (g)	Inoculo misto	$Y = 1,79375 - 0,01611x - 0,00010x^2$	0,97**
	<i>G. etunicatum</i>	$Y = 1,9891 - 0,01272x$	0,99**
	<i>G. intraradices</i>	$Y = 0,21500 + 0,01278x - 0,00010x^2$	0,77**
	Sem fungo	$Y = 0,43173 - 0,0023x$	0,67**

5

6 Verifica-se interação significativa entre as espécies de FMAs e adubação
 7 nitrogenada para as variáveis: teor e conteúdo de ajmalicina nas raízes da vinca
 8 (Figuras 6 e 7). Os teores de ajmalicina estão dentro dos valores encontrados por
 9 outros autores como Jaleel et al. (2008) e Karthikeyan et al. (2008) em raízes de
 10 vinca. O menor teor de ajmalicina foi verificado no tratamento sem fungo e com 15
 11 mg de N (0,37 mg de ajmalicina g⁻¹ de raiz) e o maior teor foi verificado no
 12 tratamento sem fungo e com 120 mg de N (2,07 mg de ajmalicina g⁻¹ raiz).

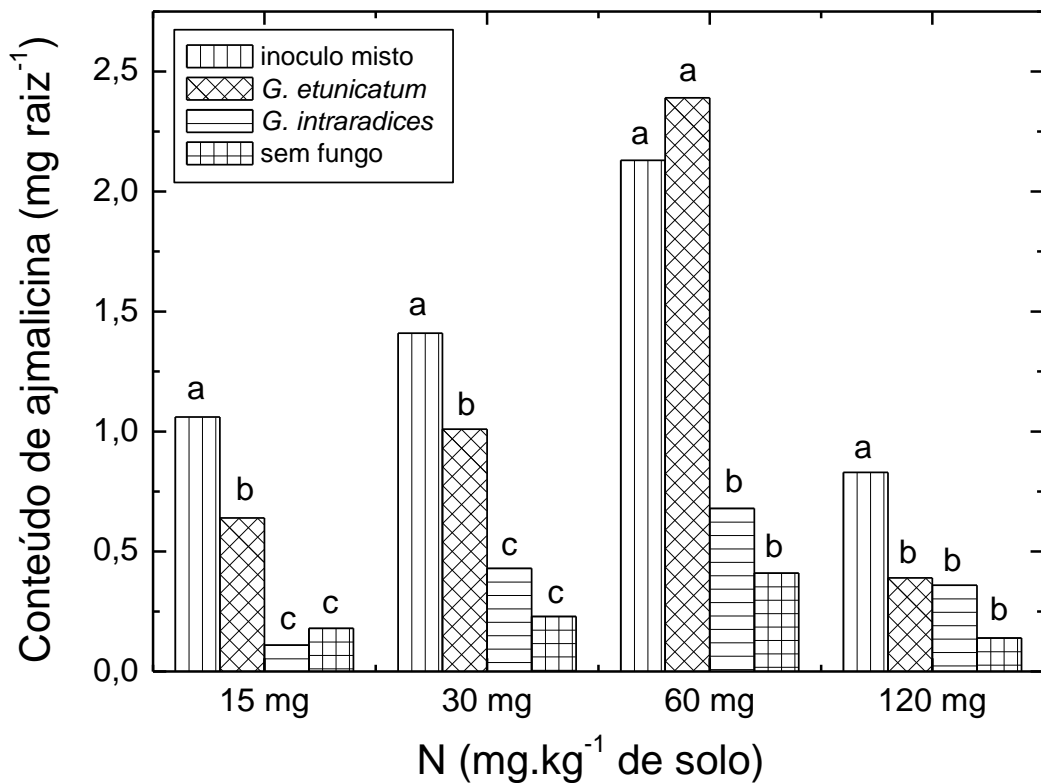
13 A produção total (conteúdo total, mg raiz⁻¹) de ajmalicina por raízes de
 14 plantas de vinca foram maiores nos tratamentos inoculados com inoculo misto ou
 15 *G. etunicatum* em associação com a aplicação de 60 mg de N por kg de solo,
 16 sendo que o incremento de ajmalicina nesses tratamentos, em relação ao
 17 tratamento sem fungo, foi de 395 e 456%, respectivamente.

18



1
2 **Figura 6.** Teor de ajmalicina em raízes de vinca em função da inoculação com
3 FMAs e da adubação nitrogenada. Médias seguidas pela mesma letra
4 no bloco não diferem entre si, pelo teste de tukey, ao nível de
5 significância de 5%.
6

7 Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que a produção de
8 ajmalicina nas raízes de vinca são influenciados tanto pela presença de fungos
9 micorrizas quanto pela adubação nitrogenada. Podemos observar que na menor
10 dose de N (15 mg), as plantas inoculadas com inoculo misto (*G. clarum* +
11 *G. margarita*) proporcionaram incrementos de 72% no teor de ajmalicina, em
12 relação ao tratamento sem fungo e que esse efeito foi proporcionado por essas
13 espécies de fungo em conjunto, pois se compararmos os resultados apresentados
14 na Figura 6, com os teores de N nas raízes, iremos verificar que os teores de N
15 nesse tratamento foi 69% menor em relação ao tratamento sem fungo, sugerindo
16 que o N pode ter sido deslocado para a produção dos compostos nitrogenados,
17 como a ajmalicina.



1

2 **Figura 7.** Conteúdo de ajmalicina em raízes de vinca em função da inoculação
 3 com FMAs e da adubação nitrogenada. Médias seguidas pela mesma
 4 letra no bloco não diferem entre si, pelo teste de tukey, ao nível de
 5 significância de 5%.

6

7

8 Além dos efeitos nutricionais as plantas micorrizadas exibem alterações
 9 metabólicas, fisiológicas e anatômicas diversas. Auxinas, citocininas, giberelinas e
 10 vitaminas acumulam-se em maior quantidade em plantas micorrizadas (tanto na
 11 parte aérea quanto nas raízes) (Moreira e Siqueira, 2006). Allen e al (1980),
 12 trabalhando com plantas de *B. gracilis*, observaram maior concentração de
 13 citocininas em folhas (57%) e raízes (111%). Shaul-Keinan et al. (2002)
 14 verificaram que a simbiose micorrízica altera as concentrações de giberelina e
 15 citocinina nas raízes de tabaco, tanto quantitativa como qualitativamente,
 16 sugerindo que um novo equilíbrio de fitormônios da planta pode estar associado
 17 com eventos pre-simbióticos. Trabalhando com suspensão de células de
catharantus roseus, amini et al, (2008) relataram que baixos níveis de ácido

1 giberélico controlam a biossíntese de ajmalicina.

2 Os metabólitos secundários de plantas participam ativamente na interação
3 planta-microrganismo, especialmente na fase pré-simbiótica, onde as plantas e os
4 fungos secretam sinais, principalmente metabólitos secundários, que são
5 percebidos pelas raízes e induzem mudanças morfológicas e fisiológicas no
6 micélio (Zhi-lin et al, 2007). Rojas-Andrade et al, (2003) afirmam que o alcalóide
7 trigonellina pode ser um importante regulador durante os eventos de sinalização e
8 da estabilização dos fungos micorrízicos arbusculares em simbiose com
9 leguminosas. Esses autores observaram incrementos desse alcalóide nas raízes
10 da leguminosa (*P. laevigata*) inoculadas com a espécie *Gigaspora*.

11 Nos últimos anos, muitos estudos se concentram na regulação da
12 micorrizas por metabólitos secundários. Extensas pesquisas foram realizadas
13 para estudar o metabolismo dos terpenóides em plantas micorrizadas (Zhi-Lin et
14 al. 2007). Foi demonstrado por Srack e Fester, (2006) que algumas raízes de
15 gramíneas micorrizadas podem acumular mycorradicina, um carotenóide, formado
16 pela via metileritritol fosfato (MEP). A biossíntese dos alcalóides produzidos por
17 *Catharanthus roseus* envolve a formação da secologanina, formada a partir do
18 monoterpene pirofosfato de geranila, ou seja, é possível que plantas micorrizadas
19 possam acumular mais alcalóides, como a ajmalicina.

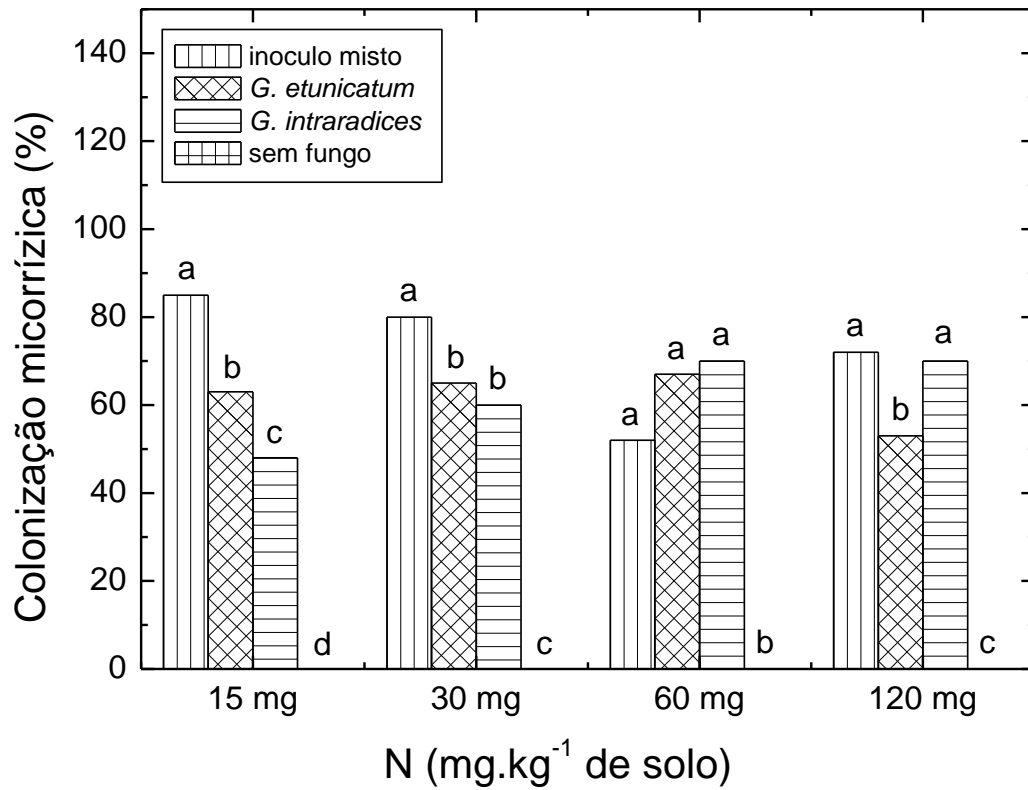
20 Um dos efeitos dos fungos micorrízicos no metabolismo das plantas é a
21 alteração na composição dos aminoácidos (Moreira e Siqueira, 2006). Nesse
22 sentido, Takahashi (2001) observou alterações nos perfis de aminoácidos na
23 parte aérea de plantas de tabaco inoculadas com fungos micorrízicos, em relação
24 a plantas não micorrizadas e concluiu que os fungos micorrízicos podem alterar o
25 metabolismo de N nas plantas. Esse autor verificou que aminoácidos como serina
26 foram incrementados na parte aérea, quando as plantas de tabaco foram
27 cultivadas com 150 mg N na forma de uréia e inoculado com a espécie *Glomus*
28 *clarum* e que nesse mesmo tratamento, também ocorreu as maiores
29 porcentagens de colonização micorrízica. Uma vez que a serina é um dos
30 substratos para formação do triptofano e que a biossíntese da ajmalicina, tem
31 como precursores a triptamina, derivada da descarboxilação do aminoácido
32 triptofano, pode-se sugerir que o acúmulo de aminoácidos pode ser associado à
33 produção de alcalóides como a ajmalicina.

1 Com relação ao maior teor de ajmalicina verificado no tratamento sem
2 fungo e com 120 mg de N (2,07 mg de ajmalicina), podemos afirmar que os teores
3 de nitrogênio nas raízes mostrados na Figura 9 (45,1 g kg⁻¹) que proporcionaram
4 tais incrementos. Avaliando os teores de alcalóides em folhas e raízes de
5 genótipos de vinca cultivados em doses crescentes de nitrogênio, Sreevalli et al.,
6 (2004) concluíram que a adubação nitrogenada proporcionou incrementos
7 significativos nos teores de alcalóides, tanto nas folhas quanto nas raízes de
8 todos os genótipos estudados. Na maior dose de N estudada (150 kg ha⁻¹) os
9 incrementos foram de 42 e 32% de alcalóides nas folhas e raízes,
10 respectivamente, corroborando com os resultados apresentados.

11 Segundo Ratti et al. (2009) as espécies de FMAs do gênero *Glomus* tem
12 potencial para aumentar o crescimento e os teores de alcalóides e citocininas na
13 parte aérea da vinca. Entretanto no presente trabalho podemos observar que a
14 espécie *Glomus intraradices* não foi eficiente em incrementar parâmetros
15 avaliados, como crescimento e teores de ajmalicina na raiz. Por isso, verificar qual
16 espécie fúngica promove melhores resultados em cada planta e nos diversos
17 tipos de ambiente é de extrema importância (Smith e Read, 2008).

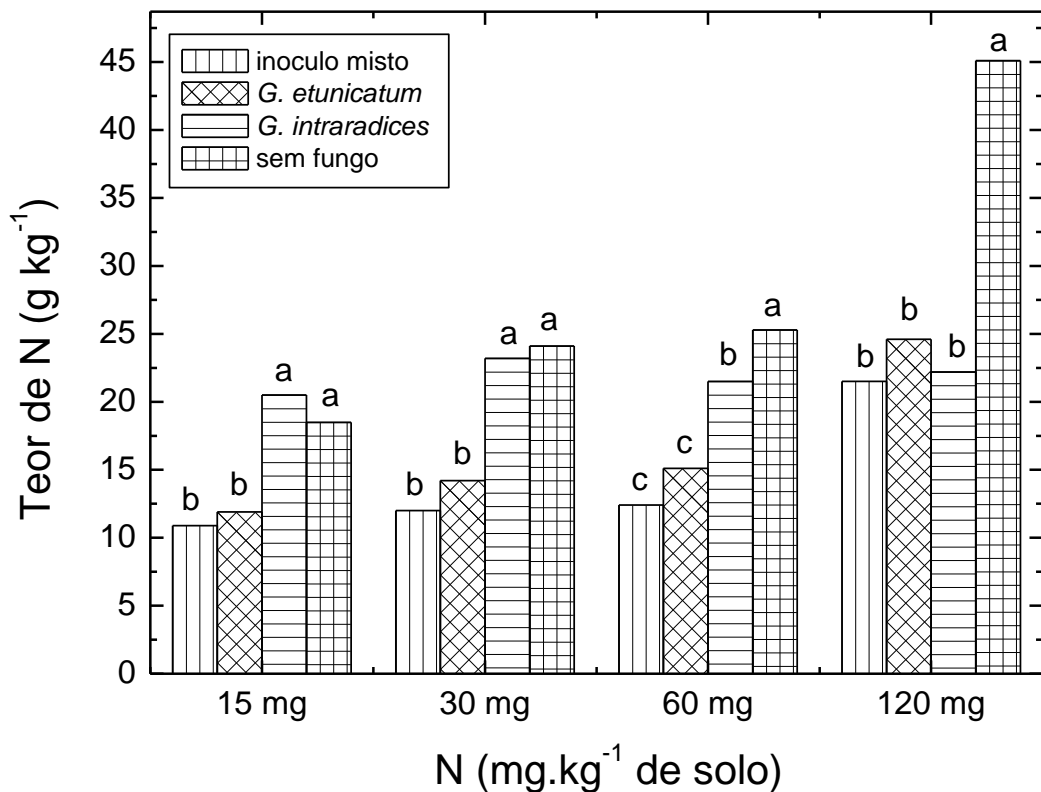
18 Verificou-se efeito das interações entre as espécies de fungos e doses de
19 N para as variáveis: porcentagem de colonização micorrízica e teor de N (Figuras
20 8 e 9). A porcentagem de colonização micorrízica variou de 48 a 85% (Figura 8),
21 sendo que a menor e a maior porcentagem foram verificadas na dose de 15 mg
22 de N por kg de solo, nos tratamentos inoculados com *G. intraradices* e inóculo
23 misto, respectivamente. Para o teor de N na massa seca da parte aérea, o
24 tratamento com inóculo misto e *G. etunicatum* proporcionaram redução dos teores
25 com variações de 57 e 72% na dose 15 mg de N e 950 e 506% na dose de 120
26 mg de N, respectivamente, em relação ao tratamento sem fungo (Figura 9). Esses
27 resultados sugerem que o N pode estar sendo translocado para produção de
28 compostos nitrogenados, como a ajmalicina, uma vez que nos mesmos
29 tratamentos (inóculo misto e *G. etunicatum*) os teores de ajmalicina foram
30 superiores ao tratamento controle (Figura 5).

31



1
2
3
4
5
6

Figura 8: Porcentagem de colonização micorrízica em raízes da vinca em função da inoculação com FMAs e da adubação nitrogenada. Médias seguidas pela mesma letra no bloco não diferem entre si, pelo teste de tukey, ao nível de significância de 5%.



1
2 **Figura 9:** Teor de nitrogênio na massa seca da raiz da vinca em função da
3 inoculação com FMAs e da adubação nitrogenada. Médias seguidas
4 pela mesma letra no bloco não diferem entre si, pelo teste de tukey,
5 ao nível de significância de 5%.

6
7 Van Iersel et al (1998) relataram que a concentração de N teve uma
8 correlação linear com a massa seca da parte aérea de mudas de *Catharanthus*
9 *roseus*. O teor de N no tecido também aumentou. Ao mesmo tempo, P e K
10 tiveram pouco ou nenhum efeito sobre o crescimento da parte aérea (Lata, 2007).

11 Outro trabalho mostrou que a aplicação de vários produtos químicos
12 exógenos podem melhorar a produção de alcalóides em *Catharanthus*
13 *roseus*. Ácido málico, betaine e o brometo de tetrametil amônio aumentaram os
14 rendimentos de ajmalicina e catharanthina em culturas de células cerca de cinco a
15 seis vezes (Zhao et al, 2000a, b).

16

17

1 **Tabela 3.** Equações de regressão da porcentagem de colonização micorrízica e
 2 do conteúdo de nitrogênio na massa seca foliar da vinca para doses de
 3 nitrogênio em função de tratamentos microbiológicos
 4

Parâmetro avaliado	Tratamentos microbiológicos	Equações	R ²
Colonização (%)	Inoculo misto	$Y = 99,16 - 1,2446x + 0,0085424x^2$	0,92**
	<i>G. etunicatum</i>	$Y = 55,83 + 0,3543x - 0,003166x^2$	0,82*
	<i>G. intraradices</i>	$Y = 43,33 + 0,91612 - 0,00585x^2$	0,41**
	Sem fungo	$Y = 0$	
Teor de N (g Kg ⁻¹)	Inoculo misto	$Y = 8,534 + 0,1011x$	0,91**
	<i>G. etunicatum</i>	$Y = 9,871 + 0,11772x$	0,95**
	<i>G. intraradices</i>	$Y = 21,8$	
	Sem fungo	$Y = 19,17 + 0,0334x + 0,001514x^2$	0,97*

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

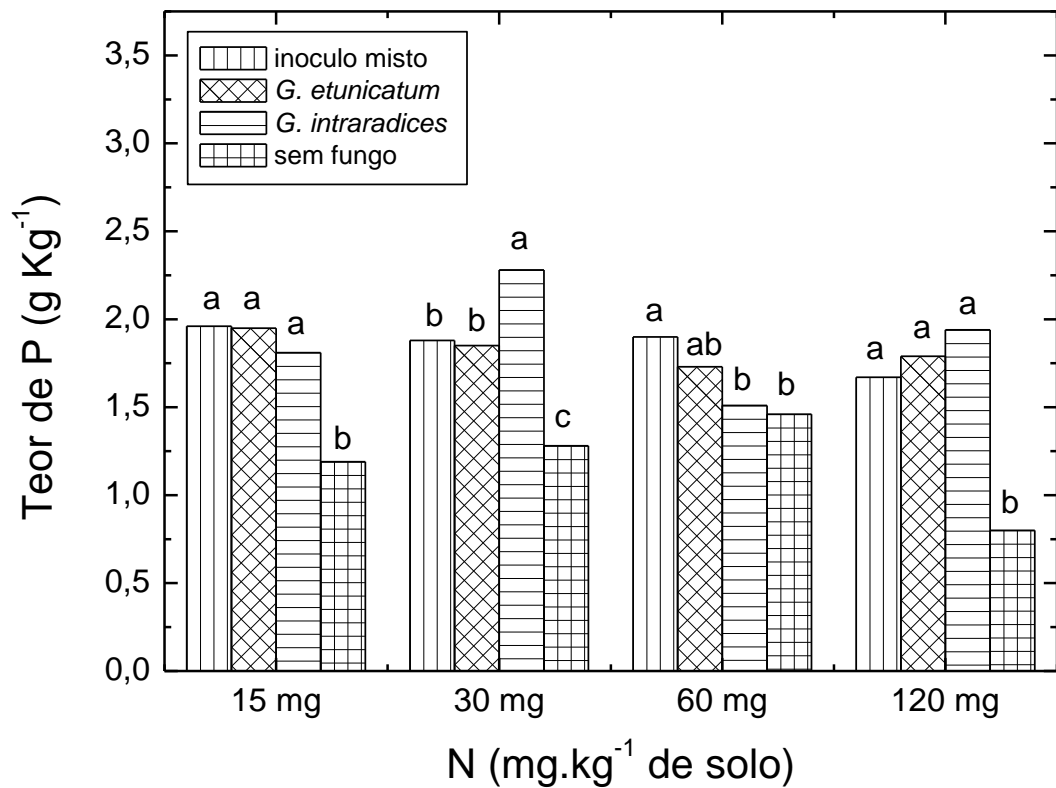
18

19

20

21

Para o teor de fósforo (Figura 10) e potássio (Figura 11) na massa seca da parte aérea da vinca, observa-se interação significativa entre as espécies de FMAs e doses de N. Em todas as doses de N estudadas, o tratamento com inóculo misto proporcionaram incrementos no teor de P, que variaram de 64% para as plantas de vinca inoculadas com inóculo misto e na dose 15 mg de N. Para a maior dose de N utilizada no experimento (120 mg de N) o incremento foi de 109%, para as plantas tratadas com inoculo misto. Uma vez que o fósforo é componente integral de compostos importantes das células vegetais, incluindo os nucleotídeos utilizados no metabolismo energético das plantas (como ATP) e no DNA e RNA, seus teores influenciam diretamente na produção de alcalóides. (Taiz e Zeiger, 2004). Gershenzon (1984) relata em sua revisão que os efeitos da adição de fósforo são variáveis. A ausência de P resultou na redução do teor de cafeína em folhas de café (*Coffea arabica* L.) conforme descrito por Mazzafera (1999)

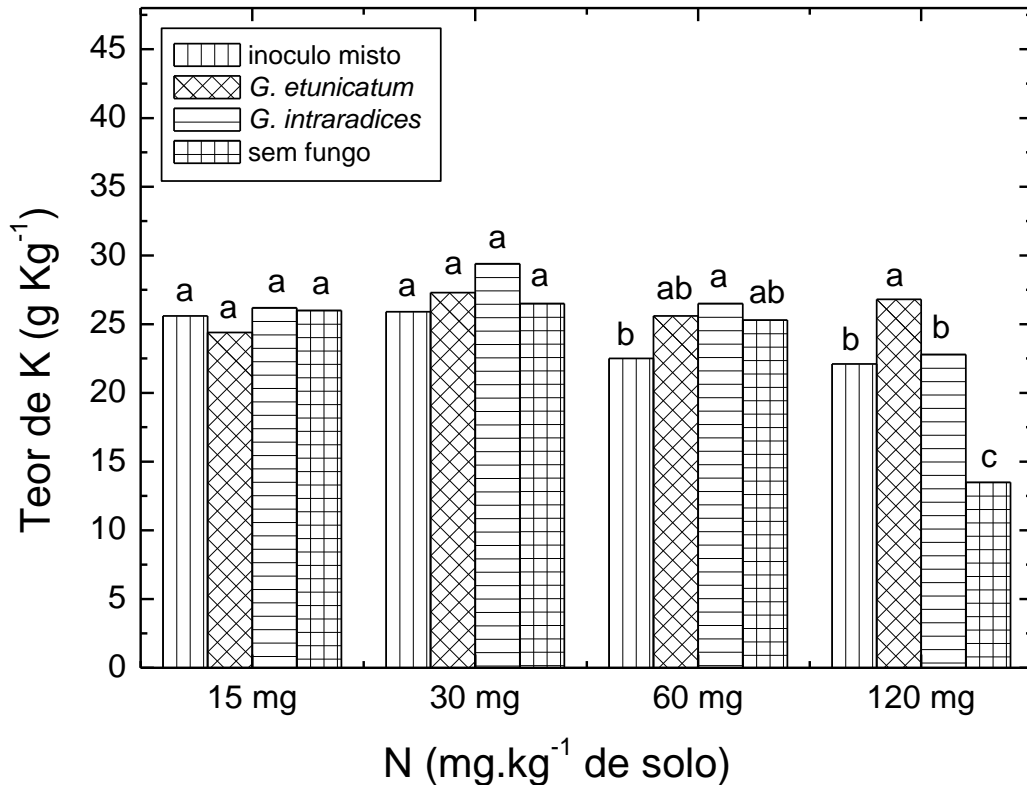


1
2 **Figura 10:** Teor de fósforo na massa seca da raiz da vinca em função da
3 inoculação com FMAs e da adubação nitrogenada. Médias seguidas
4 pela mesma letra no bloco não diferem entre si, pelo teste de tukey,
5 ao nível de significância de 5%.

6
7
8 Para o teor de K, os incrementos foram de 63, 98 e 69%, para os
9 tratamentos inoculo misto, *G. etunicatum* e *G. intraradices*, respectivamente, na
10 maior dose de N estudada, apesar do potássio ser um macronutriente ele não é
11 um componente estrutural. Contudo ele está presente em altas concentrações no
12 suco celular regulando o potencial osmótico e o balanço iônico. Esse nutriente
13 também está envolvido no controle do movimento estomático, além de executar o
14 papel de cofator enzimático para muitas reações metabólicas, no metabolismo
15 dos carboidratos.

16 Com relação à produção de alcalóides, Gershenzon (1984) relata que ao
17 contrario da adubação nitrogenada, adubações com potássio usualmente
18 decrescem os teores de alcalóides. Mazzafera (1999), estudando o efeito do

1 suprimento dos nutrientes sobre o teor de cafeína em folhas de café (*Coffea*
2 *arabica* L.), observou que na ausência de K, houve um incremento no teor de
3 cafeína.



4
5 **Figura 11:** Teor de potássio na massa seca da raiz da vinca em função da
6 inoculação com FMAs e da adubação nitrogenada. Médias seguidas
7 pela mesma letra no bloco não diferem entre si, pelo teste de tukey,
8 ao nível de significância de 5%.

9

10 O cálcio possui um papel estrutural (está presente nos pectatos de cálcio
11 que compõem a lamela média) e um grande papel na regulação do metabolismo
12 da planta. Ele normalmente atua como mensageiro secundário ativando uma
13 proteína chamada calmodulina, a qual, por sua vez, ativa uma série de enzimas.
14 O magnésio está presente na molécula da clorofila, juntamente com o nitrogênio.
15 O magnésio também faz parte de muitas metaloenzimas, ou seja, as enzimas que
16 possuem um metal em sua estrutura (Taiz & Zeiger, 2006)

17 Na Figuras 12 e 13 verifica-se interação significativa para as variáveis: teor
18 de Ca e Mg na massa seca da raiz da vinca. Observa-se que em todas as doses

de N estudadas, a inoculação das plantas de vinca com *G. etunicatum* proporcionaram redução nos teores de Ca, onde na menor dose de N a redução foi de 15 % e 25% para a maior dose de N comparado ao tratamento sem fungo (Figura 12).

Zhao et al (2001) realizaram um trabalho com cultura de células de *Catharanthus roseus* e demonstraram que o influxo de cálcio desempenha um papel fundamental na biossíntese de alcalóides. Entretanto, são necessários mais estudos para elucidar uma relação funcional entre transportadores Ca^{+2} localizados no tonoplasto de *Catharanthus* e a regulação da biossíntese de alcalóides indólicos.

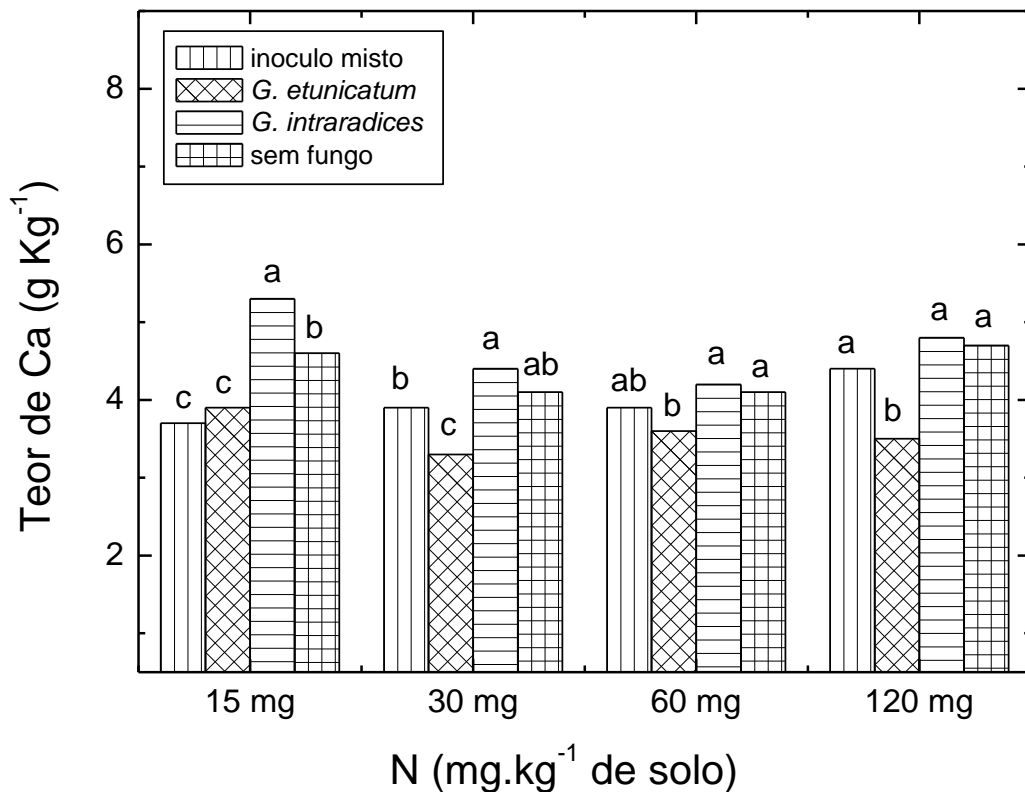
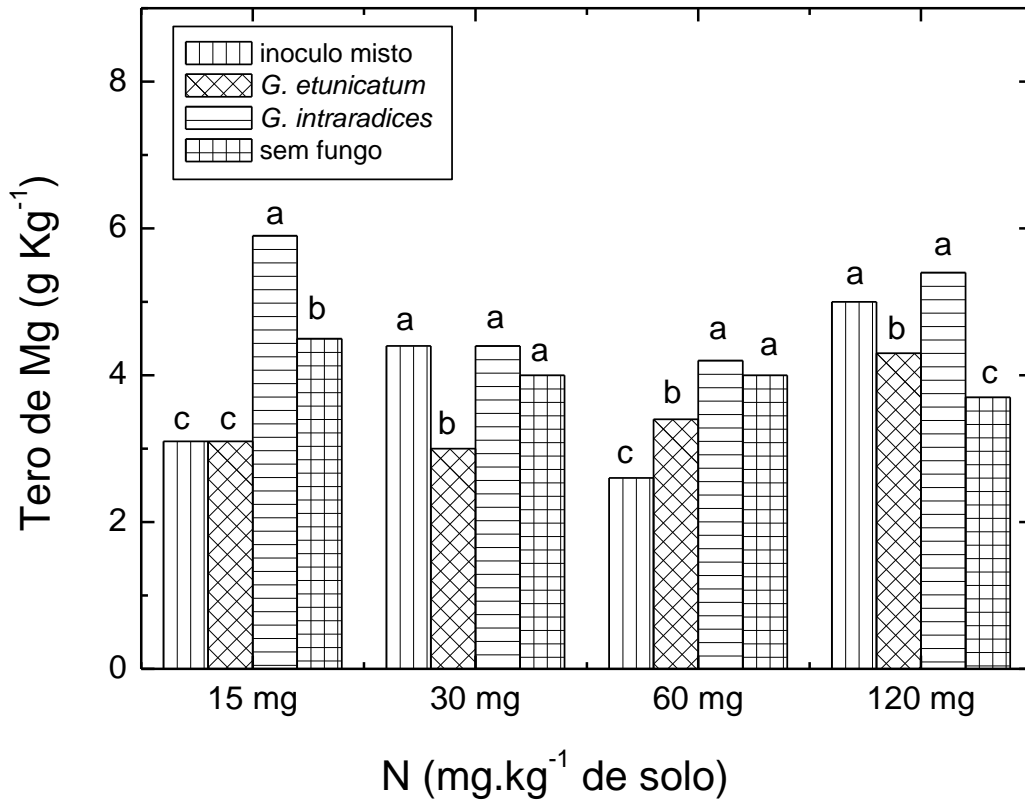


Figura 12: Teor de cálcio na massa seca da raiz da vinca em função da inoculação com FMA's e da adubação nitrogenada. Médias seguidas pela mesma letra no bloco não diferem entre si, pelo teste de tukey, ao nível de significância de 5%.

Na Figura 13, observa-se que em todas as doses de N estudadas, a inoculação das plantas de vinca com *G. intraradices* proporcionaram incrementos

1 nos teores de Mg, onde na menor dose de N o incremento de Mg foram de 31 %
 2 na menor dose e 46% para a maior dose de N estudada.
 3



4 **Figura 13:** Teor de magnésio na massa seca da raiz da vinca em função da
 5 inoculação com FMAs e da adubação nitrogenada. Médias seguidas
 6 pela mesma letra no bloco não diferem entre si, pelo teste de tukey,
 7 ao nível de significância de 5%.
 8

10

11 Conclusões

12

- 13 • As plantas de vinca inoculadas com inoculo misto (*G. margarita* + *G.*
 14 *clarum*) e *G.etunicatum* proporcionaram incrementos na altura, no número
 15 de folhas, na massa seca da parte aérea e da raiz e teores de P, em todas
 16 as doses de N estudadas.

- 1 • As plantas de vinca inoculadas com inoculo misto (*G. margarita* + *G.*
2 *clarum*) proporcionaram incrementos nos teores de ajmalicina em todas as
3 doses de N estudadas, exceto para a dose de 120 mg de N.
- 4 • A maior produção de ajmalicina nas raízes da vinca foram obtidas nos
5 tratamentos inoculados com inoculo misto (*G. margarita* + *G. clarum*) e *G.*
6 *etunicatum* em associação com a aplicação de 60 mg de N por kg de solo.
- 7 • Os teores de N nas raízes de vinca foram reduzidos nos tratamentos com
8 inoculo misto e *G. etunicatum* comparados ao tratamento sem fungo, em
9 todas as doses de N estudadas.

10

11

Referências Bibliográficas

12

- 13 ABU-ZEYAD, R. et al 1999 Occurrence of arbuscular mycorrhiza in
14 *Castanospermum australe* A. Cunn. & C. Fraser and effects on growth and
15 production of castanospermine. *Mycorrhiza*, v. 9, p.111-117.
- 16 AMINI, A., et al 2009 Low levels of gibberellic acid control the biosynthesis of
17 ajmalicine in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Planta med.* v.75,
18 p.187-191.
- 19 ATUL-NAYYAR, A. et al., 2009. The arbuscular mycorrhizal symbiosis links N
20 mineralization to plant demand. *Mycorrhiza*. v.19, p.239-246.
- 21 DEWICK, P. M. 1997 *Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach*. West
22 Sussex (England): John Wiley e Sons, 466p.
- 23 GERSHENZON, J. 1984 Changes in the levels of plant secondary metabolites
24 under water and nutrient stress. In: TIMMERMANN, B. N., STEELINK, C.,
25 LOEWS, F.A. (eds.). *Phytochemical adaptations to stress*, p.273-230.
- 26 GRACE C; STRIBLEY P. 1991. A safer procedure for routine staining of vesicular-
27 arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research*, 95: 1160-1162.
- 28 HALLARD, D. 2000 Transgenic plant cells for the production of indole alkaloids.
29 Ph.D Thesis, University of Leiden
- 30 HOODGE, A. et al., 2001. An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates
31 decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature*
32 v.413, p.297-299.
- 33 JACKSON ML. 1965. *Soil chemical analysis*. New Jersey: Prentice Hall, 498 p.

- 1 JALEEL CA, GOPI R, ALAGU LAKSHMANAN GM, PANNEERSELVAM R 2008
2 Interactive effects of triadimefon and salt stress on antioxidant status and
3 ajmalicine accumulation in *Catharanthus roseus* . *Acta Physiology Plant*. v.30,
4 287-292p.
- 5 KARTHIKEYAN, B., et al 2008 The effect of AM fungi and phosphorous level on
6 the biomass yield and ajmalicine production in *Catharanthus roseus*. *EurAsian*
7 *Journal of BioSciences*. v.2, p.26-33.
- 8 KULKARNI, Y.S. et al. 2004 Increasing the content of leaf and root alkaloids of
9 higher alkaloid content mutants of periwinkle through nitrogen fertilization.
10 *Industrial Crops and Products*, v.19, p.191-195.
- 11 LATA, B. 2007. Cultivation, mineral nutrition and seed production of *Catharanthus*
12 *roseus* (L.) G. Don in the temperate climate zone. *Phytochemistry review*. v. 6,
13 p. 403-411.
- 14 LOU, Y., BALDWIN, I.T. 2004 Nitrogen supply influences herbivore-induced direct
15 and indirect defenses and transcriptional responses in *Nicotiana attenuata*.
16 *Plant Physiology*, American Society of Plant Biologists, v.135, p.496-506
- 17 MALAVOLTA E; VITTI GC; OLIVEIRA SA. 1997. *Avaliação do estado nutricional*
18 *das plantas: princípios e aplicações*. 2.ed., Piracicaba: POTAFOS, 319 p.
- 19 MAZZAFERA, P. 1999. Mineral nutrition and caffeine content in coffee leaves.
20 *Bragantia*, Campinas, v.58, p.387-391.
- 21 RATI, N. et al. 2010. Effect of *Glomus* species on physiology and biochemistry of
22 *Catharanthus roseus*. *Indian J. Microbiol*. v. 50, p.355-360.
- 23 ROJAS-ANDRADE, R. et al. 2003 Changes in the concentration of trigonelline in a
24 semi arid leguminous plant (*Proposis laevigata*) induced by an arbuscular
25 mycorrhizal fungus during the presymbiotic phase. *Mycorrhiza* , v. 13, p.49-52.
- 26 SAWERS, R.J.H. et al. 2008. Cereal mycorrhiza: an ancient symbiosis in modern
27 agriculture. *Trends in plant science*. v.13, p.93-97.
- 28 SHAUL-KEINAN, O., et al 2002 Hormone concentration in tobacco roots change
29 during arbuscular mycorrhizal colonization with *Glomus intraradices*. *New*
30 *Phytologist*, v.154, p.501-507.
- 31 SOTTOMAYOR, M. et al 2004 Peroxidase and the biosynthesis of terpenoid
32 indole alkaloids in the medicinal plant *Catharanthus roseus* L G. Don.
33 *Phytochemistry Reviews*, 3 p. 159-171.

- 1 SREEVALLI, Y. et al 2004 Increasing the content of leaf and root alkaloids of high
2 alkaloid content mutants of periwinkle through nitrogen fertilization. *Industrial*
3 *Crops and Products*, v.19, p. 191-195.
- 4 TAIZ, T.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. Ed. Artmed, Porto Alegre, 3 ed., 2006,
5 719p.
- 6 TAKAHASHI, D. (2001) Atividade de urease e concentração de aminoácidos em
7 tabaco inoculado com fungos micorrízicos arbusculares. Tese (Mestrado em
8 Agronomia, área de concentração solos e nutrição de plantas) - Esalq – SP,
9 Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
10 58p.
- 11 TANAKA Y.; YANO, K. 2005 Nitrogen delivery to maize via mycorrhizal hyphae
12 depends on the form of N supplied. *Plant Cell Environ*, v.28, p. 1247–1254.
- 13 TINKER E NYE 2000
- 14 VAN IERSEL, M.W., et al 1998 Fertilizer effects on the growth of impatiens,
15 petunia, salvia, and vinca plug seedlings. *HortSci*, v.33, p.678-682.
- 16 ZHAO, J. et al. 2000a. Improved indole alkaloid production in *Catharanthus roseus*
17 suspension cultures by various chemicals. *Biotechnol Lett*. v.22. p.1221-1226.
- 18 ZHAO, J. et al. 2000b. Promotion of indole alkaloid production in *Catharanthus*
19 *roseus* cell cultures by rare earth elements. *Biotechnol Lett*. v.22. p.825-828.
- 20 ZHAO, J. et al. 2001. Elicitor-induced indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus*
21 *roseus* cell cultures is related to Ca⁺² influx and the oxidative burst. *Plant Sci*. v.
22 161, p.423-431.
- 23 ZHI-LIN, Y., et al 2007 Regulation and accumulation of secondary metabolites in
24 plant-fungus symbiotic system. *African Journal of Biotechnology*, v.6, p.1266-
25 1271.

26

27

28

29

30

31

32

33

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

5. ARTIGO Nº 2

Bioprodução de Ajmalicina em *Catharanthus roseus* Inoculadas com Micorrizas Arbusculares e Adubadas com Fósforo

Resumo - A ajmalicina é um alcalóide indólico encontrado em grande quantidade em raízes de *Catharanthus roseus* (L) G. Don. Esse alcalóide tem sido amplamente estudado por apresentar importante ação anti-hipertensiva. O experimento teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes espécies de Fungos Micorrizas Arbusculares sobre o crescimento, composição mineral e teores de alcalóides em raízes de *Catharanthus roseus* (L.) G. DON, cultivada em diferentes doses de fósforo. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com quatro doses de fósforo (0, 50, 100 e 200 mg Kg⁻¹ de P na forma de KH₂PO₄) e dois tratamentos microbiológicos [*Glomus etunicatum*; inóculo misto (*Glomus clarum* e *Gigaspora margarita*) e sem fungo], com quatro repetições. A unidade experimental foi composta por dois vasos contendo 4 Kg de

1 substrato e quatro plantas por vaso. As plantas foram colhidas sessenta dias após
 2 o plantio, em pleno florescimento. Determinou-se a altura, número de folhas,
 3 massa seca da parte aérea e raiz, porcentagem de colonização micorrízica nas
 4 raízes, teores de N, P, K, Ca, Mg e ajmalicina nas raízes. Os maiores incrementos
 5 na altura, número de folhas, massa seca da parte aérea e raiz e nos teores de N,
 6 P, K, Ca e Mg foram obtidos na ausência de adubação fosfatada. O maior teor e
 7 conteúdo de ajmalicina foi encontrado em plantas inoculadas com inoculo misto
 8 associado a uma aplicação de 50 mg de P por Kg de solo.

9
 10 **Termos para indexação:** alcalóides, Apocynaceae, *Glomus etunicatum*, *Glomus*
 11 *clarum*, *Gigaspora margarita*

12
 13 **Abstrat** - This alkaloid has been extensively studied by presenting important
 14 antihypertensive action. The objective of this study was to evaluate the effects of
 15 different AMF species on growth, mineral composition and content of alkaloids
 16 in *Catharanthus roseus* (L.) G. DON roots, grown in different phosphorus levels.
 17 The experimental design was randomized blocks with four doses of phosphorus
 18 (0, 50, 100 and 200 mg P kg⁻¹ in the form of KH₂PO₄) and two microbiological
 19 treatments [*Glomus etunicatum*; mixed inoculum (*Glomus clarum* and *Gigaspora*
 20 *margarita*) and without fungus] with four replications. The experimental
 21 unit consisted of two pots containing 4 kg of substrate and four plants per pot.
 22 Plants were harvested sixty days after planting in full bloom. It was determined the
 23 height, leaf number, dry mass of shoot and root, percentage of mycorrhizal
 24 colonization in the roots, N, P, K, Ca, Mg and ajmalicine. The largest increases in
 25 height, leaf number, dry mass of shoots and roots and N, P, K, Ca and Mg were
 26 obtained in the absence of phosphorus. The largest content and content ajmalicine
 27 found in plants inoculated with mixed inoculum associated with an application of
 28 50 mg P per kg soil.

29
 30 **Key words:** Alkaloids, Apocynaceae, *Glomus etunicatum*, *Glomus clarum*,
 31 *Gigaspora margarita*

32 33 **Introdução**

34
 35 A espécie *Catharanthus roseus* é uma planta originária de Madagascar e
 36 apresenta-se como um subarbusto. A análise fitoquímica possibilitou a

1 identificação de vários alcalóides, destacando-se vincristina e vimblastina, que
2 são encontrados nas folhas e ajmalicina que é encontrada nas raízes. Esses
3 alcalóides têm grande importância para a indústria farmacêutica, sendo a
4 vincristina e vimblastina indicadas para o tratamento de leucemia e ajmalicina
5 usada como anti-hipertensivo.

6 Os efeitos benéficos dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) têm sido
7 demonstrados nas mais variadas condições e espécies vegetais, na maioria dos
8 casos, estimulando o crescimento vegetal como uma consequência de seu efeito
9 sobre a nutrição da planta, principalmente no aumento da absorção de fósforo.
10 Entretanto o benefício da associação vai depender de vários fatores como:
11 genótipo da planta, espécie de fungo e disponibilidade de fósforo no solo.

12 Este trabalho teve como objetivo estudar a influência dos FMAs e da
13 adubação fosfatada sobre o crescimento e teores de N, P, K, Mg, Ca e ajmalicina
14 em raízes de vinca.

15 **Material e métodos**

16 *Local e delineamento experimental*

17
18 O experimento foi realizado em casa de vegetação na Universidade
19 Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, localizada em Campos dos
20 Goytacazes, RJ (latitude = 21°19'23"; longitude = 41°10'40" w; altitude = 14 m).
21 durante a condução do experimento, a temperatura mínima diária variou de 19,0°C
22 a 29,0°C, sendo a média de 23,2°C, e a temperatura máxima diária variou de
23 28,0°C a 40,0°C com a média de 36,0°C.

24 O delineamento experimental adotado foi o de blocos casualizados em
25 arranjo fatorial 3 x 4, sendo 3 tratamentos microbiológicos [*Glomus etunicatum*
26 (Becker & Gerdeman); inóculo misto (*Glomus clarum* Nicolson & Schenck e
27 *Gigaspora margarita* Becker & Hall) e sem fungo] e 4 doses de fósforo (0, 50, 100
28 e 200 mg kg⁻¹ de P na forma KH₂PO₄), com 4 repetições. A unidade experimental
29 foi composta por dois vasos plásticos contendo 4 kg de substrato e quatro plantas
30 por vaso.
31
32
33

1 *Preparo do substrato*

2

3 O substrato utilizado para o experimento foi um solo, classificado como
4 cambissolo háplico tb distrófico típico, coletado na profundidade de 0-20 cm,
5 peneirado, misturado com areia 1:2 (v/v) e esterilizado em autoclave por 2 vezes,
6 a uma temperatura de 121°C por 1 hora. após a autoclavagem, o substrato
7 apresentou as seguintes características químicas: pH em água = 6,5; matéria
8 orgânica= 7,24 g dm⁻³; P= 9,0 mg dm⁻³; S= 14,0 mg dm⁻³; K⁺=0,7 mmol_c dm⁻³;
9 Ca²⁺=16,7 mmol_c dm⁻³; mg²⁺= 10,7 mmol_c dm⁻³; Al³⁺= 0,0 mmol_c dm⁻³; H+Al= 1,3
10 mmol_c dm⁻³; Sb= 28,6 mmol_c dm⁻³; T= 29,90 mmol_c dm⁻³; Fe= 39,30 mg dm⁻³; Cu=
11 0,47 mg dm⁻³; Zn= 1,92 mg dm⁻³; Mn= 108,9 mg dm⁻³ e B= 0,73 mg dm⁻³.

12 Foi realizada correção química do substrato, adicionando K (92,7 mg kg⁻¹)
13 na dose 0 de P, utilizando-se como fonte KCl em solução aquosa. na dose 50,
14 100 e 200 de P foi adicionado K (92,7 mg kg⁻¹) e P (50, 100 e 200 mg kg⁻¹),
15 utilizando como fonte KCl e KH₂PO₄, Na₂HPO₄. Depois de corrigido, o solo foi
16 mantido por 15 dias incubado, devidamente molhado, sendo posteriormente
17 realizadas extrações de P (Mehlich⁻¹) nas doses 0, 50, 100 e 200 de P, obtendo-
18 se 8,7; 25; 55; 110 mg kg⁻¹ de P, respectivamente. Foi realizada adubação com
19 nitrogênio utilizando como fonte NH₄NO₃ (20 mg kg⁻¹ de N).

20

21 *Preparo do inóculo dos FMAs*

22

23 A multiplicação do inóculo foi realizada antes da implantação do
24 experimento, sendo o substrato utilizado uma mistura de solo e areia 1:2 (v/v),
25 esterilizado em autoclave por duas vezes, a 121°C, por 1 hora. Ao substrato,
26 colocado em vasos com capacidade de 3 kg, foram adicionados 50 g de inóculo
27 inicial, constituindo uma mistura de solo contendo esporos, hifas e raízes
28 colonizadas, com o fungo de cada espécie a ser estudada: *Glomus clarum*,
29 *Gigaspora margarita*, *Glomus intraradices* e *Glomus etunicatum*. O inóculo inicial
30 dos fungos foi obtido da coleção do setor de microbiologia do solo da UENF. A
31 seguir, 15 sementes de *Brachiaria brizantha*, desinfestadas com solução 0,5% de
32 hipoclorito de sódio durante 10 min e lavadas com água deionizada, foram
33 semeadas em cada vaso. Quatro meses após a semeadura, a parte aérea foi

1 cortada e trinta dias após o corte, a mistura de solo contendo esporos, hifas e
2 raízes finas cortadas, foi utilizada como inóculo.

3

4 *Propagação e inoculação da vinca*

5

6 Foram utilizadas como material propagativo, sementes de vinca rósea,
7 fórmula mix da Susntorm. Foram plantadas 20 sementes por vaso. Antes de
8 semear, foram adicionados 50 g do inóculo das espécies FMAs nos tratamentos
9 inoculados. Os inóculos foram colocados 2-3 cm abaixo da superfície do solo. As
10 plantas foram irrigadas diariamente, utilizando-se água desionizada. Aos 20 dias,
11 após o plantio, foi feito o primeiro desbaste, permanecendo 10 plantas mais
12 vigorosas em cada vaso, e aos 40 dias o segundo, deixando-se 4 plantas por
13 vaso.

14

15 *Colheita e variáveis analisadas*

16

17 As plantas foram colhidas sessenta dias após o plantio, em pleno
18 florescimento. Determinou-se a altura, número de folhas, massa seca da parte
19 aérea e raiz, porcentagem de colonização micorrízica nas raízes, teores de N, P,
20 K, Ca e Mg na massa seca da parte aérea.

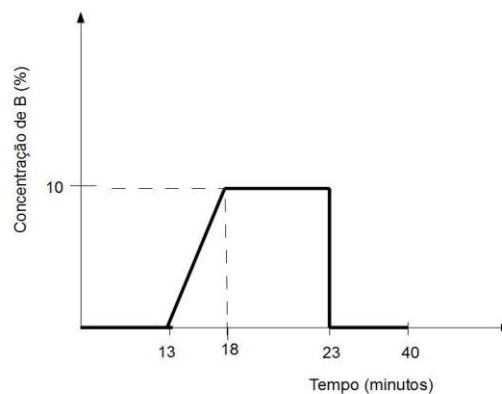
21 A medição da altura foi realizada com o auxílio de uma régua milimetrada.
22 A parte aérea foi seca em estufa de ventilação forçada, a uma temperatura de
23 40°C por 5 dias, após esse período foi determinada massa seca foliar.

24 As raízes finas foram coletadas, lavadas com água, cortadas em
25 aproximadamente 2 cm de comprimento e armazenadas em álcool etílico 50%
26 para posterior avaliação da porcentagem de colonização radicular. Para
27 determinar a porcentagem de colonização micorrízica, as raízes foram coloridas
28 segundo Grace e Stribley (1991), com as seguintes adaptações, KOH 5% a 80°C.
29 As raízes foram levadas ao microscópio para observação da presença de
30 estruturas de FMAs.

31 A parte aérea seca e as raízes secas foram moídas em moinho do tipo
32 Willey e armazenadas em frasco hermeticamente fechado. Nas raízes foram
33 determinados os teores de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e

1 magnésio (Mg), para isso o material vegetal foi submetido à oxidação pela
2 digestão sulfúrica, obtendo-se o extrato, no qual se determinou o nitrogênio pelo
3 método de Nessler (Jackson, 1965), o fósforo pelo método colorimétrico do
4 molibdato, o potássio por espectrofotometria de emissão de chama e o cálcio e
5 magnésio por absorção atômica (Malavolta et al., 1997).

6 A extração da ajmalicina nas raízes foi realizada a partir de 10 mg de
7 raízes, 1 mL de H_3PO_4 , 0,25M. O material foi submetido a homogeneização, e
8 posteriormente, centrifugado por 30 minutos a 14000 g. Em seguida, o material foi
9 submetido ao banho ultrassônico por 30 minutos, conforme metodologia de
10 Hallard (2000). A determinação da ajmalicina foi realizada por cromatografia
11 líquida de alta eficiência, usando aparelho da marca Shimadzu, equipado com
12 uma coluna C18 "Low TFA" utilizando detector de PDA. As condições
13 cromatográficas foram as seguintes: fluxo de $0,5 \text{ ml min}^{-1}$, fase móvel constituída
14 por solvente A (água, acetonitrila e ácido trifluoroacético nas concentrações 79:
15 21:0,01) e solvente B (água, acetonitrila e ácido trifluoroacético nas
16 concentrações 5: 95: 0,01), com gradiente de eluição descrito na Figura 1.



17 Figura 1: Gradiente de eluição da fase móvel

18

19 Para a análise quantitativa da ajmalicina utilizou-se o método do padrão
20 externo, empregando ajmalicina como referência. Os pontos da curva padrão
21 foram: 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1 mg mL^{-1} para ajmalicina. As soluções foram
22 preparadas em H_3PO_4 , e injetadas nas mesmas condições das amostras. O
23 comprimento de onda utilizado foi de 254 nm.

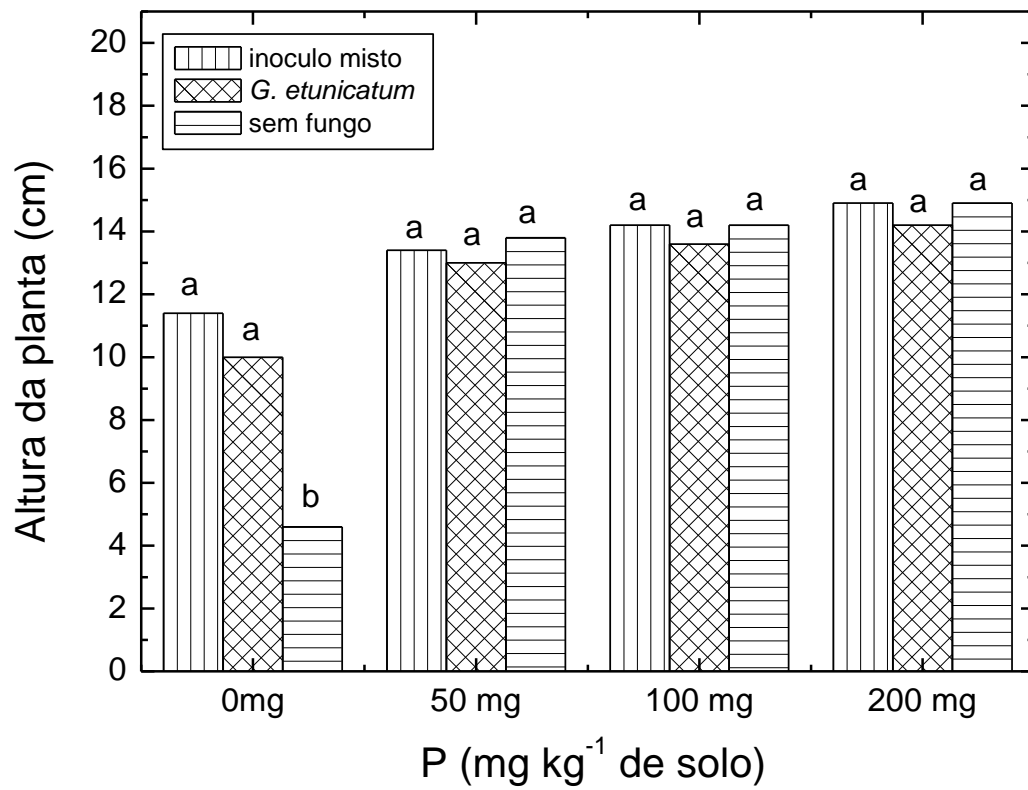
1 Com as áreas obtidas nos cromatogramas para cada concentração definida
2 dos padrões foram montadas as equações do tipo $y = a + bx$, onde $y =$
3 concentração e $x =$ área. As áreas das amostras foram introduzidas nessa
4 equação e obtidas as respectivas concentrações em mg mL^{-1} para se obter a
5 concentração de ajmalicina.

6 *Análise estatística*

7
8
9 Os dados foram submetidos à análise de variância. Para os dados
10 quantitativos, como o fator dose de N, foi utilizada análise de regressão
11 polinomial, teste F da análise de variância da regressão e coeficientes do modelo
12 estatisticamente significativo e maior R^2 . Para os dados qualitativos, no caso do
13 fator tratamento microbiológicos, será utilizado o teste de Tukey a 5% de
14 probabilidade.

15 **Resultados e discussão**

16
17
18 O crescimento das plantas é afetado pela presença de fungos micorrizas e
19 também pela presença de nutrientes no solo. Verificou-se efeito das interações
20 entre as espécies de fungos e doses de P para as variáveis altura e número de
21 folhas de vinca (Figura 1 e Tabela 1). Na ausência da adubação fosfatada, os
22 tratamentos inoculados com inoculo misto e *G. etunicatum* proporcionaram
23 incrementos de 147 e 117% para altura e 200 e 140% para número de folhas em
24 relação ao tratamento sem fungo (Figura 2). Diniz (2007) observou um
25 crescimento significativo em plantas de seringueira colonizadas por *Glomus*
26 *clarum* e adubadas com 50 mg/dm^3 de P, comparado as plantas não inoculadas.
27 No mesmo trabalho verificou-se que a ausência de fungos micorrizas associada a
28 uma adubação elevada de P (50 mg/dm^3) resultou em um incremento na altura
29 das plantas.



1
2 **Figura 1:** Teste de média para altura da vinca em função da inoculação com
3 FMAs e da adubação fosfatada. Médias seguidas pela mesma letra em
4 cada bloco não diferem entre si, pelo teste de tukey, ao nível de
5 significância de 5%.

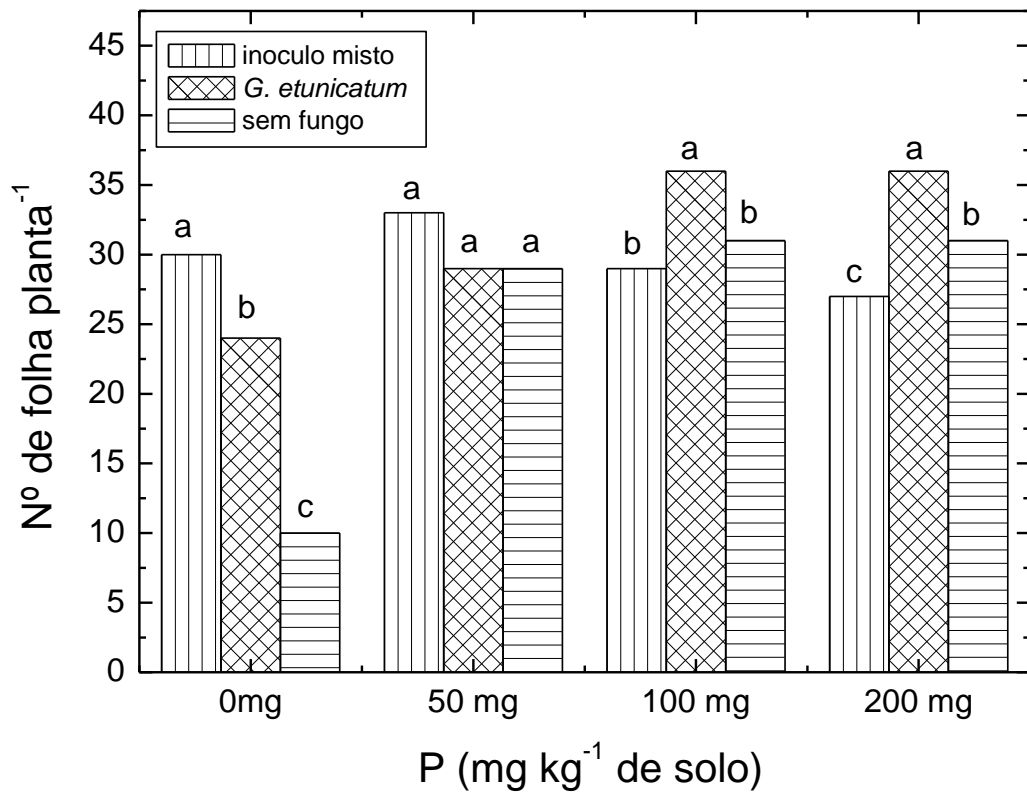
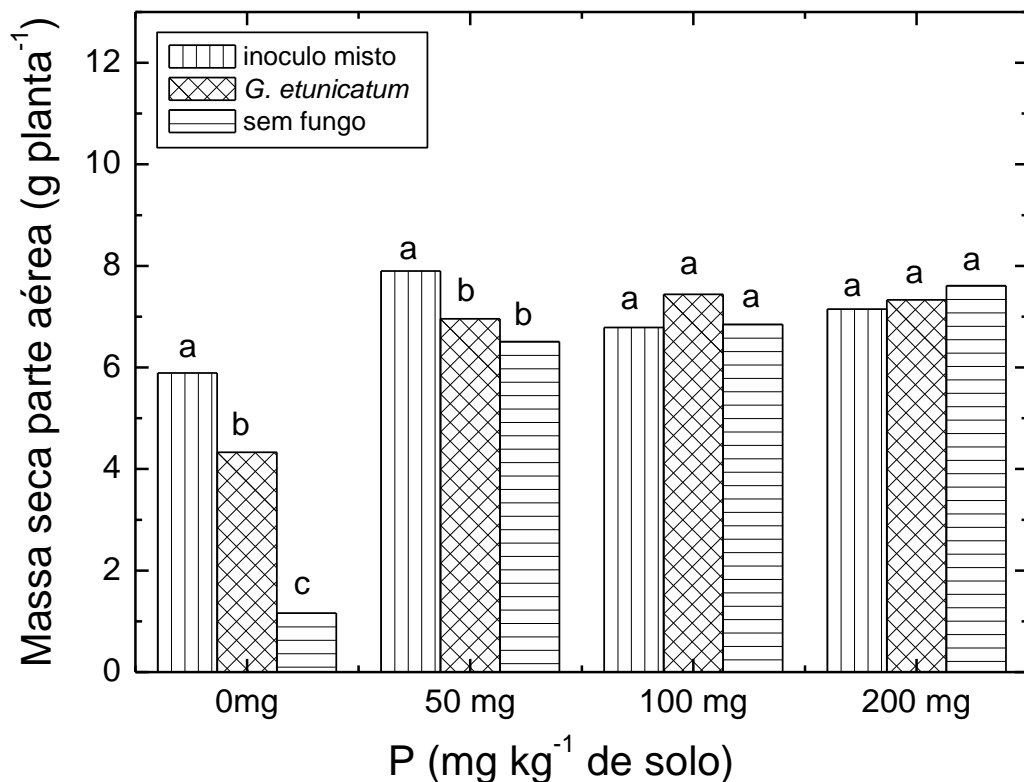


Figura 2: Teste de média para número de folhas da vinca em função da inoculação com FMAs e da adubação fosfatada. Médias seguidas pela mesma letra em cada bloco não diferem entre si, pelo teste de tukey, ao nível de significância de 5%.

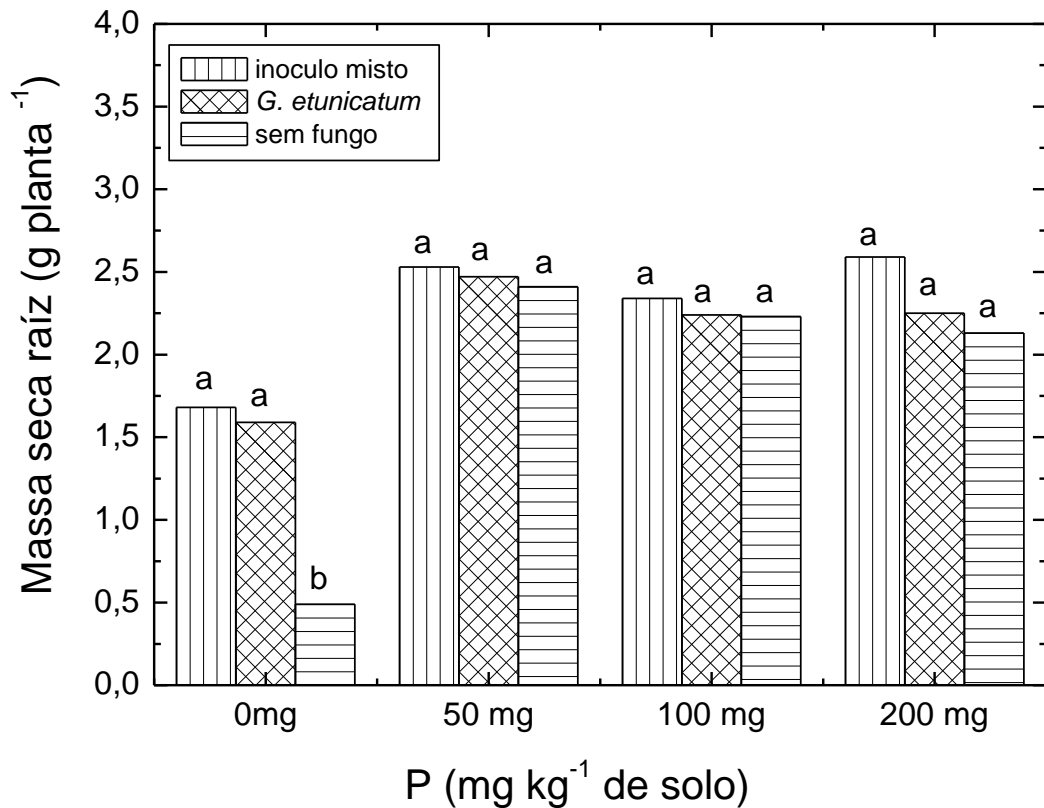
Tabela 1. Equações de regressão para altura de plantas e número de folhas da vinca para doses de fósforo em função de tratamentos microbiológicos

Parâmetro avaliado	Tratamentos microbiológicos	Equações	R ²
Altura de plantas (cm)	Inoculo misto	$Y = 10,2 + 0,1088x - 0,000631x^2$	0,92**
	<i>G. etunicatum</i>	$Y = 8,74 + 0,1338x - 0,000738x^2$	0,86**
	Sem fungo	$Y = 1,45 + 0,3696x - 0,002158x^2$	0,76**
Nº folha por planta	Inoculo misto	$Y = 31,8 - 0,03761x$	0,50*
	<i>G. etunicatum</i>	$Y = 18,9 + 0,4203x - 0,002244x^2$	0,99**
	Sem fungo	$Y = 2,92 + 0,8208x - 0,004880x^2$	0,79**

1 Houve interação dos FMAs e das doses de P em relação à variável massa
 2 seca da parte aérea e da raiz da vinca (Figuras 3 e 4 e Tabela 2). Na ausência da
 3 adubação fosfatada, as maiores produções de massa seca da parte aérea da
 4 vinca foram obtidas nos tratamentos inoculados com inoculo misto (*Glomus*
 5 *clarum* + *Gigaspora margarita*) e *G. etunicatum*, que aumentaram 408 e 273%,
 6 respectivamente, em relação ao tratamento sem fungo (Figura 3). Para massa
 7 seca da raiz o incremento foi de 243% para as raízes inoculadas com inóculo
 8 misto e 224% para as raízes inoculadas com *G. etunicatum* (Figura 4) comparado
 9 ao tratamento sem fungo. Na dose 50 mg de P, a inoculação com inóculo misto
 10 proporcionou incrementos de 21% na massa seca da parte aérea. O maior
 11 acúmulo de massa seca da parte aérea e raiz está associado ao maior
 12 crescimento das plantas (Figura 1).



13 **Figura 3:** Teste de média para massa seca da parte aérea da vinca em função da
 14 inoculação com FMAs e da adubação fosfatada. Médias seguidas pela
 15 mesma letra em cada bloco não diferem entre si, pelo teste de tukey, ao
 16 nível de significância de 5%.
 17



1
2 **Figura 4:** Teste de média para massa seca da raiz da vinca em função da
3 inoculação com FMAs e da adubação fosfatada. Médias seguidas pela
4 mesma letra em cada bloco não diferem entre si, pelo teste de tukey, ao
5 nível de significância de 5%.

6

7 Karthikeyan *et al* (2008) confirmaram que a inoculação de fungos
8 micorrizas arbusculares associado ao tratamento com diferentes doses de fósforo
9 (100, 150 e 200 Kg) foram eficientes no incremento de biomassa e também no
10 conteúdo de ajmalicina em *Catharanthus roseus*.

11 Diniz (2007) observou que a presença dos fungos micorrizas e a adubação
12 fosfatada resultaram em incremento na massa seca da parte aérea verificando
13 que o maior acúmulo de matéria seca da parte aérea está associado ao maior
14 crescimento dos caules de seringueira.

15 Verificou-se, tanto nas plantas inoculadas quanto nas não inoculadas,
16 regressão quadrática para a produção de massa seca (Tabela 2). As maiores
17 produções de massa seca foram obtidas com doses de P estimadas em 131, 140

1 e 148 mg de P kg⁻¹ de solo, para os tratamentos inoculo misto, *G. etunicatum* e
2 sem fungo, respectivamente.

3

4 **Tabela 2.** Equações de regressão para massa seca da parte aérea e da raiz da
5 vinca para doses de fósforo em função de tratamentos microbiológicos
6

Parâmetro avaliado	Tratamentos microbiológicos	Equações	R ²
Massa seca da parte aérea (g)	Inoculo misto	Y= 5,330 + 0,0394x – 0,00015x ²	0,85**
	<i>G. etunicatum</i>	Y= 4,956 + 0,0280x – 0,00010x ²	0,87**
	Sem fungo	Y= 1,756 + 0,0873x -0,000294x ²	0,83**
Massa seca da raiz (g)	Inoculo misto	Y= 1,926 + 0,0000616x	0,50**
	<i>G. etunicatum</i>	Y= 1,485 + 0,0257x -0,00016342x ²	0,40*
	Sem fungo	Y= -0,047 + 0,0708x -0,000445x ²	0,65**

7

8

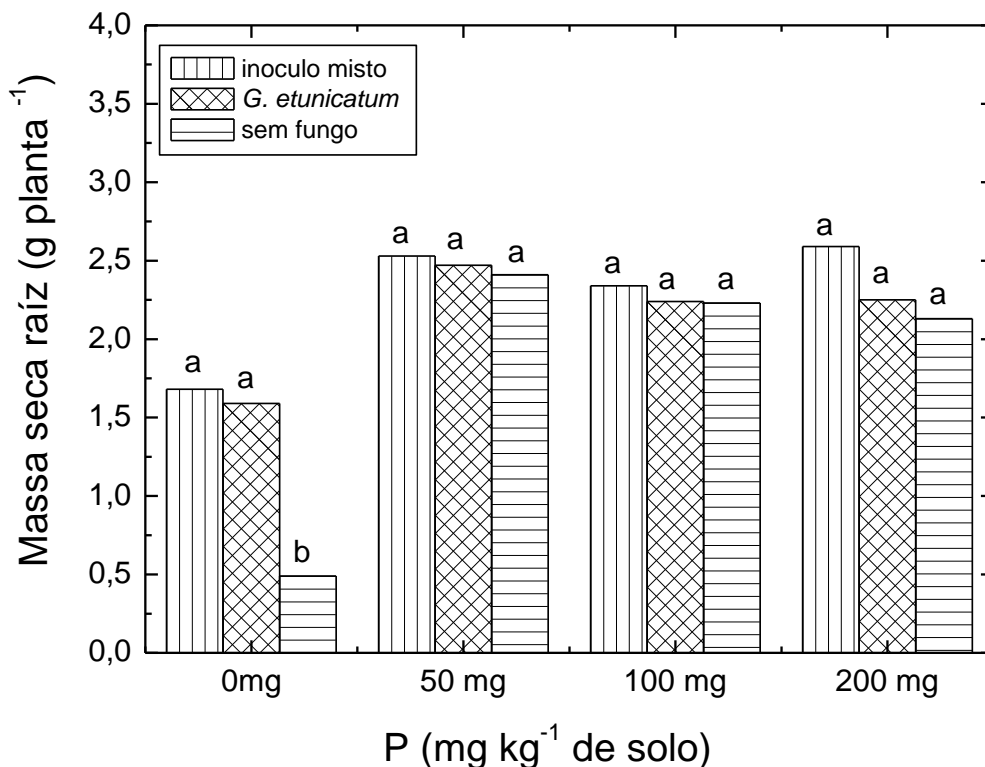
9 Resultados semelhantes foram relatados por Kapoor et al (2007) que
10 demonstraram que a inoculação de fungos micorrizas arbusculares e / ou
11 adubação fosfatada tiveram efeito significativo em todas as variáveis de
12 crescimento medido de plantas de *Artemisia annua* L. No entanto, o nível de
13 crescimento das plantas foi aumentado variando entre os fungos inoculantes.
14 Inoculação das plantas no solo enriquecido com P aumentou ainda mais a
15 biomassa da parte aérea. O tratamento *Glomus fasciculatum* + P produziu até dez
16 vezes mais biomassa do que em plantas controle não inoculadas.

17 Quando não se utilizou adubação fosfatada, a maior porcentagem de
18 colonização micorrízica foi de 100%, observada no tratamento inoculado com
19 inoculo misto (*G. clarum* + *G. margarita*) (Figura 7), o qual proporcionou a maior
20 produção de massa seca (Figuras 3 e 4).

21 Verificou-se interação significativa entre as espécies de FMAs e adubação
22 fosfatada para as variáveis: teor e conteúdo de ajmalicina nas raízes da vinca
23 (Figuras 5 e 6). Os teores de ajmalicina estão dentro dos valores encontrados por
24 outros autores como Jaleel et al. (2008) e Karthikeyan et al. (2008) em raízes de
25 vinca. O menor teor de ajmalicina foi verificado no tratamento sem fungo e com 0
26 mg de P (0,49 mg g⁻¹ de MS da raiz) e o maior teor foi verificado no tratamento
com inóculo misto e com 50 mg de P (1,86 mg g⁻¹ de MS da raiz).

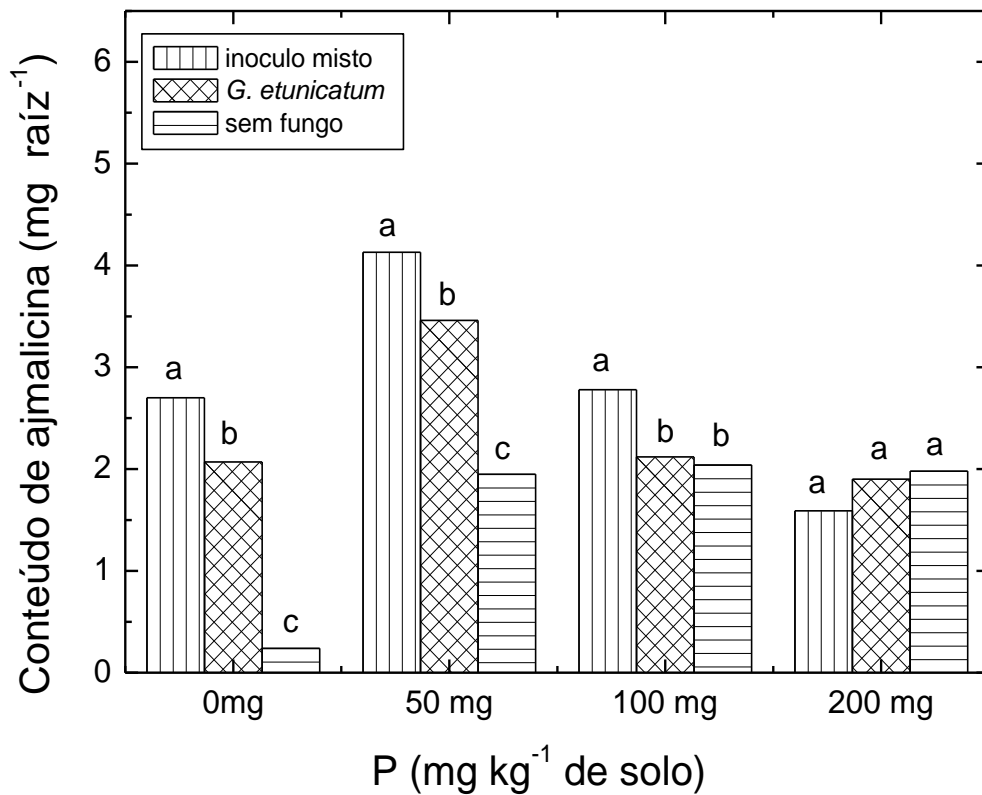
1 A produção total (conteúdo total) de ajmalicina por raízes de plantas de
 2 vinca foi maior nos tratamentos inoculados com inoculo misto ou *G. etunicatum*
 3 em associação com a aplicação de 60 mg de P por kg de solo, sendo que o
 4 incremento de ajmalicina nesses tratamentos, em relação ao tratamento sem
 5 fungo, foi de 395 e 456%, respectivamente (Figura 5).

6 Segundo Moreira e Siqueira (2006), plantas micorrizadas exibem
 7 alterações metabólicas, fisiológicas e anatômicas, e vários metabólitos
 8 secundários se acumulam em maior quantidade em plantas com fungos
 9 micorrízicos arbusculares. Foi verificada no presente trabalho a influência dos
 10 FMAs na produção da ajmalicina nas raízes da vinca em função da adubação
 11 fosfatada (Figura 5). Com o incremento de P ocorreu um incremento no teor de
 12 ajmalicina nas plantas não inoculadas (Figura
 13 5).



14

15 **Figura 5:** Teste de média para o teor de ajmalicina em raízes de vinca em função
 16 da inoculação com FMAs e da adubação fosfatada. Médias seguidas
 17 pela mesma letra em cada bloco não diferem entre si, pelo teste de
 18 tukey, ao nível de significância de 5%.



1
2 **Figura 6:** Teste de média para o conteúdo de ajmalicina em raízes de vinca em
3 função da inoculação com FMAs e da adubação fosfatada. Médias
4 seguidas pela mesma letra em cada bloco não diferem entre si, pelo
5 teste de tukey, ao nível de significância de 5%.

6
7 Karthikeyan et al. (2008) relataram que os teores máximos de ajmalicina
8 nas raízes de vinca aos 120 dias foram 1,68 mg por g de massa seca de raiz em
9 tratamento inoculado com *Glomus mosseae* e com adição de 150 kg P₂O₅ por ha
10 e que os teores mínimos 0,45 mg g⁻¹ de massa seca de raiz foram encontrados
11 nos tratamentos sem inoculação e sem fósforo.

12 Ratti et al. (2010) determinaram que, os teores de alcalóides totais no
13 caule, folhas e raízes foram de 3,47, 8,19 e 4,24% respectivamente, no
14 tratamento com *Glomus mossae*, em comparação com 1,76, 7,27 e 3,76 no
15 tratamento controle, enquanto no tratamento com *Glomus fasciculatum* foi de
16 3,45, 8,0 e 3,89%, respectivamente. A determinação de alcalóides totais em
17 diferentes partes de *Catharanthus roseus* inoculados com *Glomus mossae* foram
18 encontrados em maior quantidade em tecido foliar (8,19%), seguido por flor

1 (8,02%), raiz (4,24%) e caule (3,47%), respectivamente. Os resultados descritos
2 mostraram ainda o efeito do tratamento *Glomus mosseae* sobre a produtividade
3 dos alcalóides verificando um aumento significativo no conteúdo de vincristina,
4 vinblastina catharanthine e vindoline no tecido foliar comparadas as plantas
5 controle.

6 Resultados semelhantes foram relatados por Kapoor (2007) que
7 verificaram que embora as concentrações de P em plantas de *Artemisia annua* L.
8 micorrizadas e não micorrizadas com *Glomus* não apresentaram diferença
9 significativa em solo enriquecido com P, as plantas micorrizadas tiveram valores
10 significativamente maiores na concentração de artemisinina.

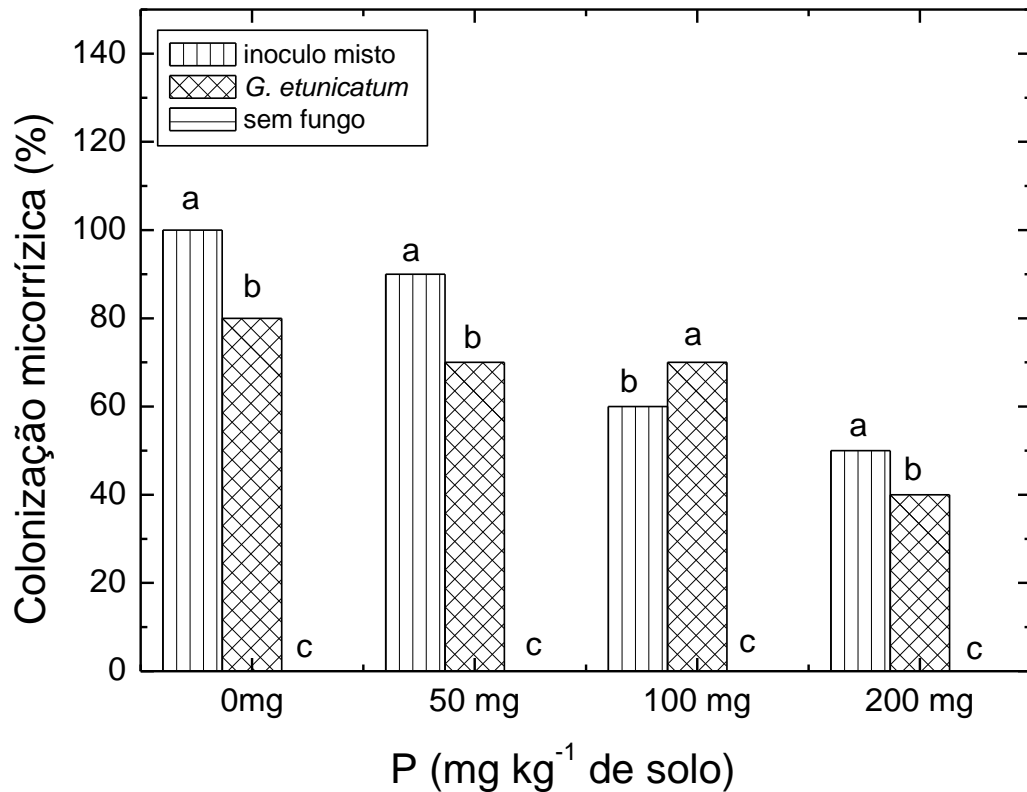
11 Para a porcentagem de raízes colonizadas pelos FMAs, houve interação
12 entre as espécies de fungo e as doses de fósforo, sendo que as espécies de
13 fungos apresentaram comportamento distinto de acordo com a disponibilidade de
14 P no solo (Figura 7). A porcentagem de colonização variou de 40 a 100%. Nos
15 tratamentos com o inóculo misto ou *Glomus etunicatum*, houve um decréscimo de
16 100 para 50% e de 80 para 40%, respectivamente, na porcentagem de
17 colonização com o incremento de P no solo. Verifica-se que, na dose 0 de P, o
18 inóculo misto apresentou maior porcentagem de colonização e se mostrou mais
19 eficiente em promover o crescimento da vinca. Já o maior incremento no teor de
20 ajmalicina, 226% foi obtido com o tratamento com *G. etunicaum* comparado ao
21 tratamento sem fungo.

22 Moreira e Siqueira relataram que em solo muito deficiente de P, a
23 aplicação de pequena quantidade desse elemento favorece a colonização e a
24 esporulação dos FMAs, sendo que estas são inibidas com doses elevadas desse
25 nutriente e o efeito da adição depende da espécie vegetal.

26 O efeito de P na colonização já é bastante conhecido e sabe-se que as
27 concentrações de P próximas do ótimo para o crescimento da planta tem um
28 efeito fungistático sobre os propágulos do fungo na rizosfera, sendo a colonização
29 reduzida. Apenas os exsudados radiculares de plantas deficientes de P estimulam
30 o crescimento assimbiótico do fungo.(Diniz, 2007)

31 As altas concentrações de P têm um efeito negativo sobre as micorrizas
32 arbusculares porque a maior concentração de P na raiz vai levar à menor
33 alocação de C para o fungo (Olsson et al, 2002). Isso justifica o fato de que

1 quando a planta está bem suprida de fósforo, ela não depende do fungo, e a
 2 presença dele torna-se um investimento energético supérfluo e sem
 3 retorno.(Diniz, 2007)



4 **Figura 7:** Teste de média para porcentagem de colonização micorrízica em raízes
 5 da vinca em função da inoculação com FOMs e da adubação fosfatada.
 6 Médias seguidas pela mesma letra em cada bloco não diferem entre si,
 7 pelo teste de tukey, ao nível de significância de 5%.
 8

9
 10 Sendo o nitrogênio elemento fundamental na produção dos alcalóides, os
 11 teores de N na planta podem estar relacionados aos teores de ajmalicina na
 12 vinca. Na Figura 8 observa-se que na ausência de P houve uma diminuição nos
 13 teores de N em todos os tratamentos comparados ao tratamento sem fungo. No
 14 mesmo tratamento observa-se que houve incremento nos teores de ajmalicina
 15 (Figura 5). Esses resultados sugerem que a presença de FOMs podem estar
 16 ativando a produção de ajmalicina em raízes de vinca gerando um decréscimo
 17 nos teores de N na ausência de adubação fosfatada.

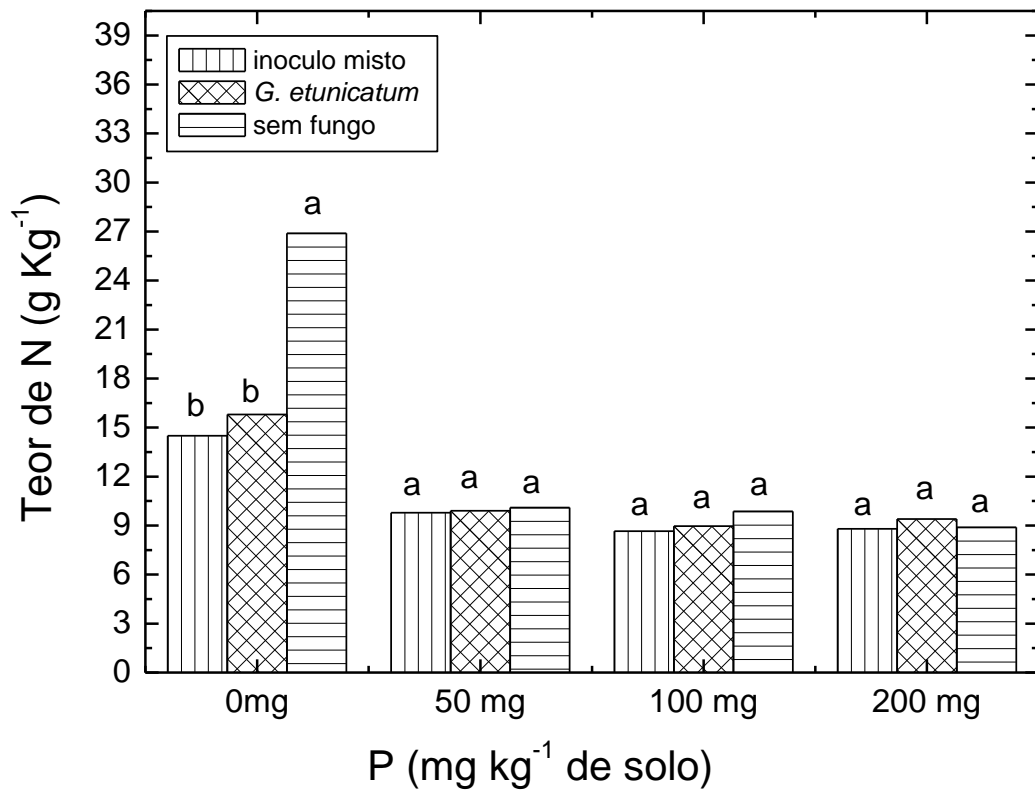
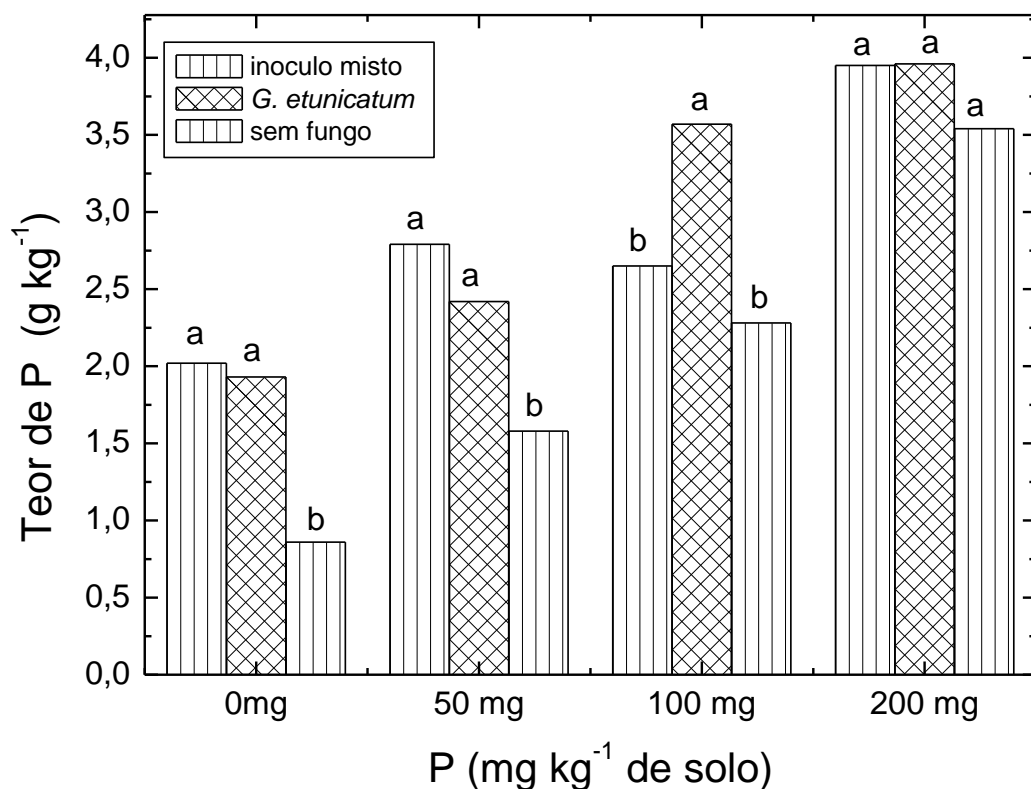


Figura 8: Teste de média para o teor de nitrogênio na massa seca da raiz da vinca em função da inoculação com FMAs e da adubação fosfatada. Médias seguidas pela mesma letra em cada bloco não diferem entre si, pelo teste de tukey, ao nível de significância de 5%.

Diniz (2007) relata que houve uma maior concentração de aminoácidos em folhas de seringueira das planta micorrizadas em relação ao tratamento sem fungo e adubação de 50 mg/dm³ de P. Um dos aminoácidos que pode ter sua concentração aumentada é o triptofano, precursor da ajmalicina. Os fatores responsáveis pela maior síntese de aminoácidos em planta micorrizadas seriam a maior captação de nitrogênio associado a uma maior disponibilidade de esqueletos de carbono.

Os maiores teores de P (Figura 9) foram obtidos na dose maior de P (200 mg) onde não se observa diferença significativa entre os tratamentos microbiológicos e o tratamento sem fungo. Esses resultados foram semelhantes aos teores de ajmalicina (Figura 5), onde na maior dose de P não se observa diferença significativa nos teores de ajmalicina em plantas micorrizadas e nas

1 plantas controle. Observa-se diferença significativa nas doses 0 e 50 mg de P nos
 2 tratamentos microbiológicos resultando no incremento nos teores de P de 134 e
 3 124% (inoculo misto e *G. etunicatum*, respectivamente) na menor dose de P e 76
 4 e 53% (inoculo misto e *G. etunicatum*, respectivamente) nas dose de 50 mg de P.
 5 Esses resultados sugerem que plantas acumularam P (200mg kg⁻¹ de solo)
 6 podem ter a produção de ajmalicina reduzida (Figuras 5 e 9).
 7



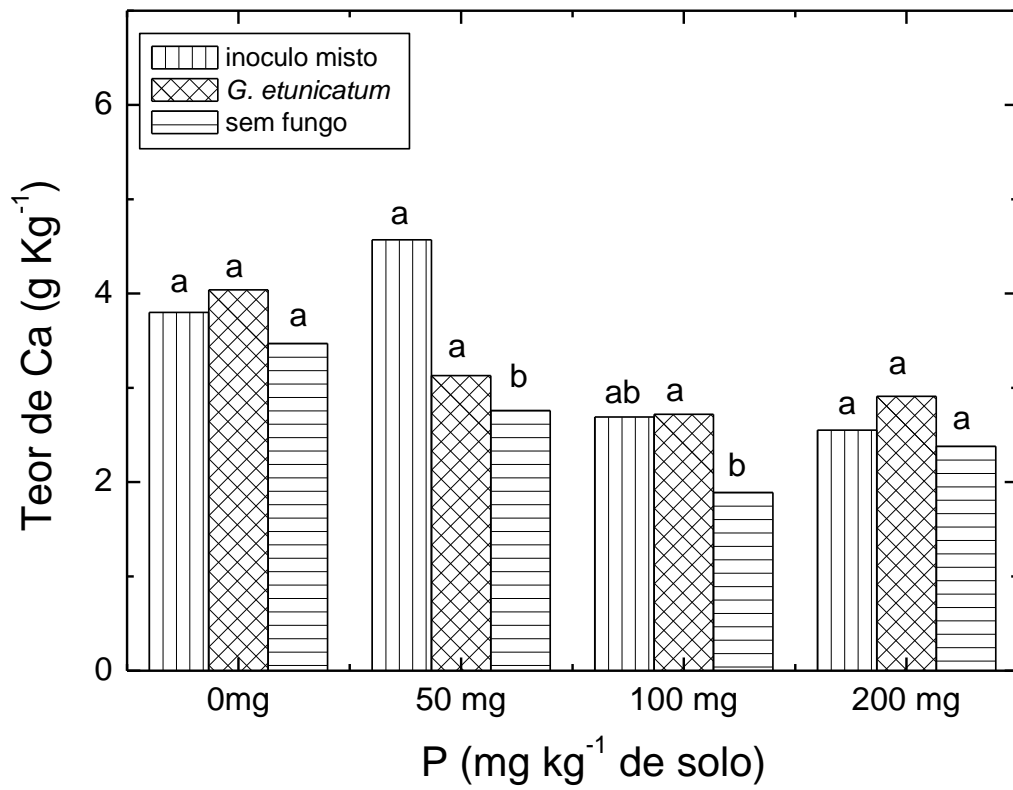
8
 9 **Figura 9:** Teste de média para teor de fósforo na massa seca da raiz da vinca em
 10 função da inoculação com FMAs e da adubação fosfatada. Médias
 11 seguidas pela mesma letra em cada bloco não diferem entre si, pelo
 12 teste de tukey, ao nível de significância de 5%.
 13

14 Kapoor et al (2007) verificaram que plantas da espécie *Artemisia annua* L.
 15 micorrizadas com *Glomus macrocarpum* e *Glomus fasciculatum* acumularam
 16 maiores quantidades de fósforo em seus brotos do que as plantas não
 17 micorrizadas. No entanto, as diferenças não foram significativas em plantas
 18 cultivadas em solo fertilizado com P.

1 Relatos semelhantes foram feitos por Abu-Zeyad et al (1999) que
2 observaram uma correlação positiva entre infecção fúngica e o teor de
3 castanospermina em sementes de árvores de *Castanospermum australe*. A
4 presença de fungos micorrizas aumentou o teor de P, o crescimento das plantas e
5 o rendimento de castanospermine nas folhas, independente do tratamento P. No
6 entanto, verificaram diferença significativa na produção de castanospermine entre
7 os tratamentos de P quando *Gigaspora margarita* foi utilizada como inóculo.

8 Ratti et al (2010) observaram que o teor de P aumentou em 31,78% no
9 caule, 21,17% nas folhas e 34,86% nas raízes de *Catharanthus roseus* inoculadas
10 com *Glomus mosseae* comparadas às plantas não inoculadas.

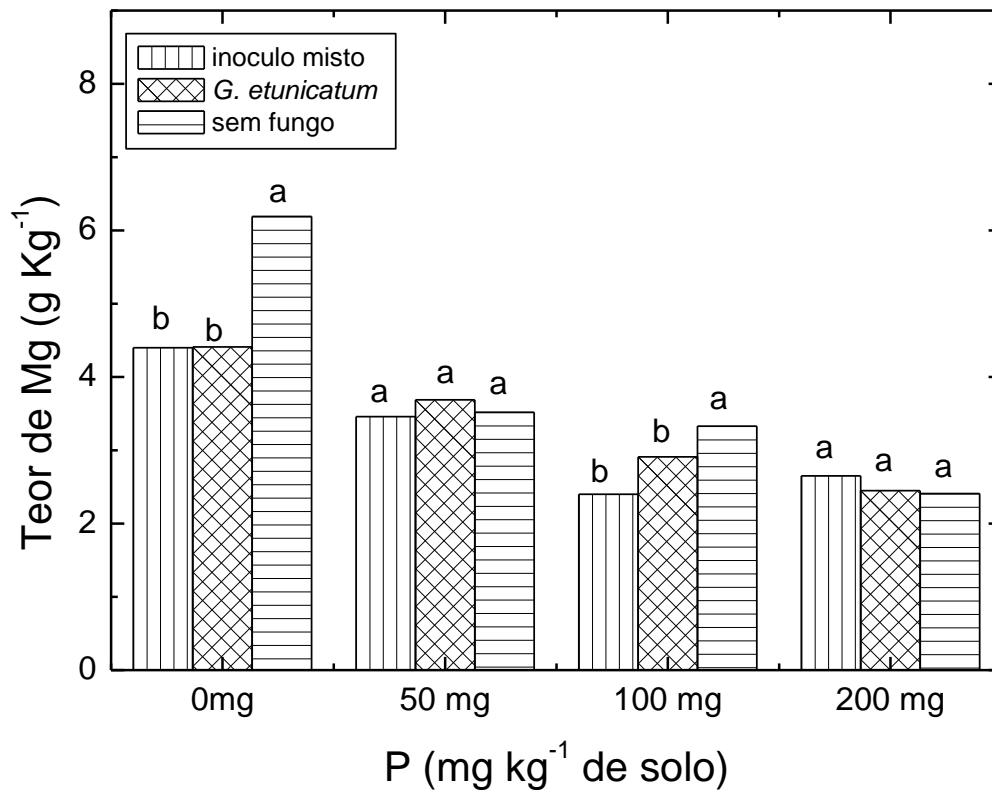
11 Os teores de cálcio (Figura 10) e magnésio (Figura 11), na parte aérea das
12 plantas de vinca foram influenciados pelos tratamentos microbiológicos e pelas
13 doses de P. Na dose de 50 mg de P observa-se um incremento de 65 e 13% nos
14 teores de Ca para os tratamentos com inóculo misto e *G. etunicatum*,
15 respectivamente (Figura 10). Os maiores teores de Mg foram obtidos na ausência
16 de adubação fosfatada, sendo que a presença de FMAs promoveu uma
17 diminuição nos teores de Mg.



1

2 **Figura 10:** Teste de média para teor de cálcio na massa seca da raiz da vinca em
 3 função da inoculação com FMAs e da adubação fosfatada. Médias
 4 seguidas pela mesma letra em cada bloco não diferem entre si, pelo
 5 teste de tukey, ao nível de significância de 5%.

6



1 **Figura 11:** Teste de média para teor de magnésio na massa seca da raiz da vinca
 2 em função da inoculação com FMAs e da adubação fosfatada. Médias
 3 seguidas pela mesma letra em cada bloco não diferem entre si, pelo
 4 teste de tukey, ao nível de significância de 5%.
 5
 6

7 Moreira e Siqueira (2006) citam que os teores de N, K, Ca, Mg e Na são
 8 geralmente menores em plantas micorrizadas, enquanto os de S e P são maiores.
 9 Entretanto, é importante ressaltar que a redução dos teores de nutrientes em
 10 plantas micorrizada resulta, na maioria dos casos, de efeitos de diluição, visto que
 11 as plantas micorrizadas acumulam mais matéria seca em relação as plantas não
 12 inoculadas.

13 **Conclusões**

- 14
- 15
- 16 • A presença de fungos micorrizas influenciaram o aumento na
 17 produção de ajmalicina em raízes de vinca;

- 1 • O maior teor e conteúdo de ajmalicina foi encontrado em plantas
2 inoculadas com inoculo misto associada a uma aplicação de 50 mg
3 de P por kg de solo;
- 4 • Na ausência da adubação fosfatada, a inoculação da vinca com
5 FMAs, promoveu maiores incrementos nos teores de ajmalicina e P,
6 na altura, número de folhas, massa seca parte aérea e raiz.
- 7 • A vinca é uma planta responsiva aos FMAs, sendo que a maior
8 produção depende da combinação da espécie de fungo com a dose
9 de P.

10

11

Referências Bibliográficas

12

13 ABU-ZEYAD, R. et al 1999 Occurrence of arbuscular mycorrhiza in
14 *Castanospermum australe* A. Cunn. & C. Fraser and effects on growth and
15 production of castanospermine. *Mycorrhiza*, v. 9, p.111-117.

16 DINIZ, P. F. A. 2007. Influência do fungo micorrízico arbuscular (*Glomus clarum*)
17 sobre características biofísicas, nutricionais, metabólicas e anatômicas em
18 plantas jovens de seringueira. Dissertação (Mestrado em Agronomia, área de
19 concentração em Fisiologia Vegetal) – UFLA – MG – Universidade Federal de
20 Lavras. 112p.

21 GRACE C; STRIBLEY P. 1991. A safer procedure for routine staining of vesicular-
22 arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research*, 95: 1160-1162.

23 HALLARD, D. 2000 Transgenic plant cells for the production of indole alkaloids.
24 Ph.D Thesis, University of Leiden.

25 JACKSON ML. 1965. *Soil chemical analysis*. New Jersey: Prentice Hall, 498 p.

26 JALEEL C.A. et al. 2008 Interactive effects of triadimefon and salt stress on
27 antioxidant status and ajmalicine accumulation in *Catharanthus roseus*. *Acta*
28 *Physiology Plant*. v.30, p.287-292.

29 KAPOOR, R., et al 2007 Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorous
30 application on artemisinin concentration in *Artemisia annua* L. *Mycorrhiza*,
31 v.17, p.581-587.

- 1 KARTHIKEYAN, B. et al. 2008 The effect of AM fungi and phosphorous level on
2 the biomass yield and ajmalicine production in *Catharanthus roseus*. *EurAsian*
3 *Journal of BioSciences*. v 2, 26-33p.
- 4 LATA, B. 2007. Cultivation, mineral nutrition and seed production of *Catharanthus*
5 *roseus* (L.) G. Don in the temperate climate zone. *Phytochemistry review*. v. 6,
6 p. 403-411.
- 7 MALAVOLTA E; VITTI GC; OLIVEIRA SA. 1997. *Avaliação do estado nutricional*
8 *das plantas: princípios e aplicações*. 2.ed., Piracicaba: POTAFOS, 319 p.
- 9 MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2ed.
10 Lavras: UFLA, 2006. p.729.
- 11 OLSSON, P.A et al. 2002 Phosphorous effects on metabolic process in monoxenic
12 arbuscular mycorrhiza cultures. *Plant Physiology*, v. 130, p.1162-1171.
- 13 RATTI, N. et al. 2010. Effect of *Glomus* species on physiology and biochemistry of
14 *Catharanthus roseus*. *Indian J. Microbiol.* v. 50, p.355-360.

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

6. RESUMOS E CONCLUSÕES

Foram instalados dois experimentos em casa de vegetação no município de Campos dos Goytacazes - RJ. O primeiro experimento teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes espécies de FMAs sobre o crescimento, composição mineral e teores de ajmalicina em raízes de *Catharanthus roseus* (L.) G. DON, cultivada em diferentes doses de nitrogênio. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com quatro doses de nitrogênio (15, 30, 60 e 120 mg Kg⁻¹ de N) e quatro tratamentos microbiológicos [*Glomus etunicatum*; inóculo misto (*Glomus clarum* e *Gigaspora margarita*); *Glomus intraradices* e sem fungo] e quatro repetições. A unidade experimental foi composta por um vaso contendo 4 Kg de substrato e quatro plantas por vaso. O segundo experimento teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes espécies de Fungos Micorrizas Arbusculares sobre o crescimento, composição mineral e teores de ajmalicina em raízes de *Catharanthus roseus* (L.) G. DON, cultivada em diferentes doses de fósforo. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com quatro doses de fósforo (0, 50, 100 e 200 mg Kg⁻¹ de P) e três tratamentos microbiológicos [*Glomus etunicatum*; inóculo misto (*Glomus clarum* e *Gigaspora margarita*) e sem fungo] e quatro repetições. A unidade experimental foi composta por dois vasos contendo 4 Kg de substrato e quatro plantas por vaso.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

As principais conclusões foram:

- A presença de fungos micorrízicos influenciaram o aumento na produção de ajmalicina em raízes de vinca;
- As plantas de vinca inoculadas com inoculo misto (*G. margarita* + *G. clarum*) e *G. etunicatum* resultaram em incrementos na altura, no número de folhas, na massa seca da parte aérea e da raiz e teores de P, em todas as doses de N estudadas.
- As plantas de vinca inoculadas com inoculo misto (*G. margarita* + *G. clarum*) apresentaram incrementos nos teores de ajmalicina em todas as doses de N estudadas, exceto para a dose de 120 mg de N.
- A maior produção de ajmalicina nas raízes da vinca foram obtidas nos tratamentos inoculados com inoculo misto (*G. margarita* + *G. clarum*) e *G. etunicatum* em associação com a aplicação de 60 mg de N por kg de solo.
- Na ausência da adubação fosfatada, a inoculação da vinca com FMAs, promoveu maiores incrementos na altura, número de folhas, massa seca parte aérea e raiz e nos teores de P e ajmalicina;
- Os maiores teores e conteúdos de ajmalicina foram encontrados em plantas inoculadas com inoculo misto associada a uma aplicação de 50 mg de P por kg de solo;
- A vinca é uma planta responsiva aos FMAs, sendo que a maior produção depende da combinação da espécie de fungo com a dose de P ou de N.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-ZEYAD, R. et al 1999 Occurrence of arbuscular mycorrhiza in *Castanospermum australe* A. Cunn. & C. Fraser and effects on growth and production of castanospermine. *Mycorrhiza*, v. 9, p.111-117.
- AL-HUMAID. 2004. Effects of compounds fertilization on growth and alkaloids of *Datura* plants. *Journal of Plant Nutrition*, v.27, n.12, p. 2203-2219.
- ALVES, H. de M. 2001 A interação dos vegetais com o meio ambiente In: Plantas como fonte de fitofármacos. Caderno Técnico de *Química Nova na Escola*, nº 3, p.1-6.
- BARIČEVIČ, D., ZUPANČIČ, A. 2002 The Impact of Drought Stress and/or Nitrogen Fertilization in Some Medicinal Plants. *Journal of Herbs, Species and Medicinal Plant*, v.9, n.2/3, p.53-64.
- BAPTISTA, M.J; SIQUEIRA, J.O. 1994 Efeito de flavonóides na germinação e no crescimento assimiótico do fungo micorrízico arbuscular *Gigaspora gigantean*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.6, p. 127-134.
- BECKER, L. 1997 *Propagação vegetativa in vitro de Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg. e *In vitro*, indução de calos, nutrição, extração e quantificação de alcalóides na espécie *Phyllanthus niruri* L. (*quebra pedra*). Dissertação (Mestrado em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal) - UFLA – MG, Universidade Federal de Lavras, 96p.
- BRESSAN, W. et al 2001 Fungos micorrízicos e fósforo, no crescimento, nos teores de nutrientes e na produção de sorgo e soja consorciados. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília: EMBRAPA, v.36, p.250-260.

- 1 CONTIN, A., et al. 1998 The inoculum size triggers tryptamine or secologanin
2 biosynthesis in a *Catharanthus roseus* cell culture. *Planta science*, v.139,
3 p.205-211.
- 4 DEWICK, P. M. 1997 *Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach*. West
5 Sussex (England): John Wiley e Sons, 466p.
- 6 EL-SAYED, M.; VERPOORTE, R. 2007 *Catharanthus* terpenoid indole alkaloids:
7 biosynthesis and regulation. *Phytochemistry Review*, v.6, p.277-305.
- 8 FINLAY, R.D. 2008 Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special
9 emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical
10 mycelium. *Journal of Experimental Botany*, v. 59, p. 1115-1126.
- 11 FREITAS, M.S.M., et al. 2004 Produção e qualidade de óleos essenciais de
12 *Mentha arvensis* em resposta à inoculação de fungos micorrízicos
13 arbusculares. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília-DF, v.39, n.9, p.887-
14 894.
- 15 FRIES, L.L.M. et al 1997 Plant growth and arbuscular mycorrhizal fungal
16 colonization affected by exogenously applied phenolic compounds. *Journal of*
17 *Chemical Ecology*, v.23, p.1755-1767.
- 18 GEORGE, E. et al. 1995 Role of arbuscular mycorrhizal fungi in uptake of
19 phosphorus and nitrogen from soil. *Crit Rev Biotechnol*. v.15, p. 257-270.
- 20 GERSHENZON, J. 1984 Changes in the levels of plant secondary metabolites
21 under water and nutrient stress. In: Timmermann, B.N., Steelink, C., Loewus,
22 F.A. (eds.). *Phytochemical adaptations to stress*, p.273-230.
- 23 GUPTA, M.L. et al. 2002 Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus
24 *Glomus fasciculatum* on the essential oil yield related characters and nutrient
25 acquisition in the crops of different cultivars of menthol mint (*Mentha arvensis*)
26 under field conditions. *Bioresource Technology*, v.81, p.77-79.
- 27 HENRIQUES, A. T. et al. 2004. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In:
28 Simões, C.M.O., Schenzel, E.P., Gosmann, G., Melo, J.C.P de, Mentz, L.A.,
29 Petrovick, P.R. coord. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto
30 Alegre: UFRGS, p.765-792.
- 31 JAIZME-VEGA, M.C. AZCÓN, R. 1995 Responses of some tropical and
32 subtropical cultures to endomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, v.5, p.213-217.

- 1 JAVOT, H. et al. 2007. Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis:
2 transport properties and regulatory roles. *Plant Cell and Environment*. v.30,
3 p.310-322.
- 4 JOHANSEN, A. et al 1996 Nitrogen metabolism of external hyphae of the
5 arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist*, v.133,
6 p.705-712.
- 7 KAPOOR, R., et al. 2007 Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorous
8 application on artemisinin concentration in *Artemisia annua* L. *Mycorrhiza*,
9 v.17, p.581-587.
- 10 KULKARNI, Y.S., et al. 2004 Increasing the content of leaf and root alkaloids of
11 higher alkaloid content mutants of periwinkle through nitrogen fertilization.
12 *Industrial Crops and Products*, v.19, p.191-195.
- 13 LATA, B. 2007. Cultivation, mineral nutrition and seed production of *Catharanthus*
14 *roseus* (L.) G. Don in the temperate climate zone. *Phytochemistry review*. v. 6,
15 p. 403-411.
- 16 LORENZI, H., MATOS, F.J.A. 2002 Plantas medicinais no Brasil: Nativas e
17 exóticas cultivadas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 512p.
- 18 LOU, Y., BALDWIN, I.T. 2004 Nitrogen supply influences herbivore-induced direct
19 and indirect defenses and transcriptional responses in *Nicotiana attenuata*.
20 *Plant Physiology*, American Society of Plant Biologists, v.135, p.496-506.
- 21 MAIER, W. et al 1995 Levels of a terpenoid glycoside (blumenin) and cell wall-
22 bound phenolics in some cereal mycorrhizas. *Plant physiology*, v. 109, p.465-
23 470.
- 24 MARCHENER, H.; DELL, B. 1994 Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant*
25 *and Soil*, v.159, p.89-102.
- 26 MARCHENER, H. 1995 *Mineral nutrition of higher plants*. London: Academic
27 Press, 889p.
- 28 MARTINS, E.R. et al 2000a *Planta medicinais*. Viçosa-MG: UFV. 200p.
- 29 MARTINS, E.R. et al 2000b Efeito de fungos micorrízicos arbusculares
30 associados a compostos fenólicos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília-
31 DF: EMBRAPA, v.35, p.1465-1471.
- 32 MAZZAFERA, P. 1999 Mineral nutrition and caffeine content in coffee leaves.
33 *Bragantia*, Campinas, v.58, n.2, p.387-391.

- 1 MELLONI, R. et al 2000 Fósforo adicionado e fungos micorrízicos arbusculares no
2 crescimento e nutrição mineral de limoeiro-cravo [*Citrus limonia* (L.) Osbeck].
3 *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. Viçosa-MG: SBCS, v.24, p.767-775.
- 4 MOREIRA, F.M. de S.; SIQUEIRA, J.O. 2006 *Microbiologia e Bioquímica do Solo*.
5 2.ed. atual. e ampl. Lavras: UFLA, 729p
- 6 NAIR, M.G. et al 1991 Isolation and identification of vesicular-arbuscular
7 mycorrhiza-stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots.
8 *Applied and environmental microbiology*, v.57, p.434-439.
- 9 NOGUEIRA, M.A., CARDOSO, E.J.B.N. 2000 Produção de micélio externo por
10 fungos micorrízicos arbusculares e crescimento de soja em função de doses
11 de fósforo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. Viçosa-MG: SBCS, v.24,
12 p.329-338.
- 13 PEIPP, H., et al. 1997 Arbuscular mycorrhizal fungus-induced changes in the
14 accumulation of secondary compounds in barley roots. *Photochemistry*, v. 44,
15 p.581-587.
- 16 PONCE, M.A. et al. 2004 Flavonoids from shoots and roots of *Trifolium repens*
17 (white clover) grown in presence or absence of the arbuscular mycorrhizal
18 fungus *Glomus intraradices*. *Phytochemistry*, v.65, p.1925–1930.
- 19 ROJAS-ANDRADE, R. et al. 2003 Changes in the concentration of trigonelline in a
20 semi arid leguminous plant (*Proposis laevigata*) induced by an arbuscular
21 mycorrhizal fungus during the presymbiotic phase. *Mycorrhiza*, v. 13, p.49-52.
- 22 ROYTRAKUL, S; VERPOORTE, R. 2007. Role of vacuolar transporter proteins in
23 plant secondary metabolism: *Catharanthus roseus* cell culture. *Phytochemistry*
24 *review*, v.6, p.383-396.
- 25 RYAN, M. H., et al. 2003 Location and quantification of phosphorus and other
26 elements in fully hydrated, soil-grown arbuscular mycorrhizas: a cryo-analytical
27 scanning electron microscopy study. *New Phytologist*, v.160, p.429
- 28 SCHIAVO, J.A. 2001 *Produção de mudas de goiabeira (Psidium guajava L.) e*
29 *Acacia mangium Willd colonizadas com fungos micorrízicos arbusculares, em*
30 *blocos prensados, confeccionados com resíduos agro-industriais*. Dissertação
31 (Mestrado em Produção Vegetal), Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade
32 Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 86p.

- 1 SCHRIPSEMA et al., 2004 Alcalóides indólicos. In: Simões, C.M.O., Schenzel,
2 E.P., Gosmann, G., Melo, J.C.P de, Mentz, L.A., Petrovick, P.R. coord.
3 *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre: UFRGS, p.819-846.
- 4 SILVEIRA, A.P.D. 1992 Micorrizas. In: Cardoso, E.J.B.N., Tsai, M.S., Neves,
5 M.C.P. *Microbiologia do Solo*. Campinas-SP:SBCS, cap. 19, p.257-282.
- 6 SIQUEIRA, J.O., et al 1991 Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza
7 formation and growth of white clover by flavonoid compounds. *New Phytol.*
8 v.118, p.87-93.
- 9 SMITH, S.E.; READ, D.J. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. California: Academic Press, 605
10 p.
- 11 SOARES, A.C.F. et al. 2005 Arbuscular mycorrhizal fungi and the occurrence of
12 flavonoids in roots of passion fruit seedlings. *Scientia Agricola*, v.62, n.4,
13 p.331-336.
- 14 SOARES, A.C.F., MARTINS, M.A. 2000 Influência de fungos micorrízicos
15 arbusculares, associada à adição de compostos fenólicos, no crescimento de
16 mudas de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Revista*
17 *Brasileira de Ciência do Solo*. v.24, p.731-740.
- 18 SOLAIMAN, M.Z.; SAITO, M. 1997. Use of sugars by intraradical hyphae of
19 arbuscular mycorrhizal fungi revealed by rediorespirometry. *New*
20 *Phytologist*. V.136, p.533-538.
- 21 SOTTOMAYOR, M., et al. 2004 Peroxidase and the biosynthesis of terpenoid
22 indole alkaloids in the medicinal plant *Catharanthus roseus* L G. Don.
23 *Phytochemistry Reviews*, 3 p. 159-171.
- 24 SREEVALLI, Y. et al. 2004 Increasing the content of leaf and root alkaloids of high
25 alkaloid content mutants of periwinkle though nitrogen fertilization. *Industrial*
26 *Crops and Products*, v.19, p. 191-195.
- 27 TAIZ, T.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. Ed. Artmed, Porto Alegre, 3 ed., 2006,
28 719p.
- 29 TAKAHASHI, D. (2001) Atividade de urease e concentração de aminoácidos em
30 tabaco inoculado com fungos micorrízicos arbusculares. Tese (Mestrado em
31 Agronomia, área de concentração solos e nutrição de plantas) - Esalq – SP,
32 Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
33 58p.

- 1 TANAKA Y.; YANO, K. 2005 Nitrogen delivery to maize via mycorrhizal hyphae
2 depends on the form of N supplied. *Plant Cell Environ*, v.28, p. 1247–1254.
- 3 TOBAR, R., et al 1994 Improved nitrogen uptake and transport from ¹⁵N-labelled
4 nitrate by external hyphae or mycorrhiza under water stressed condition. *The*
5 *New Phytologist*. v. 126, n.1, p.119-122.
- 6 ZHI-LIN, Y., et al. 2007. Regulation and accumulation of secondary metabolites in
7 plant-fungus symbiotic system. *African Journal of Biotechnology*, v.6, p.1266-
8 1271.

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

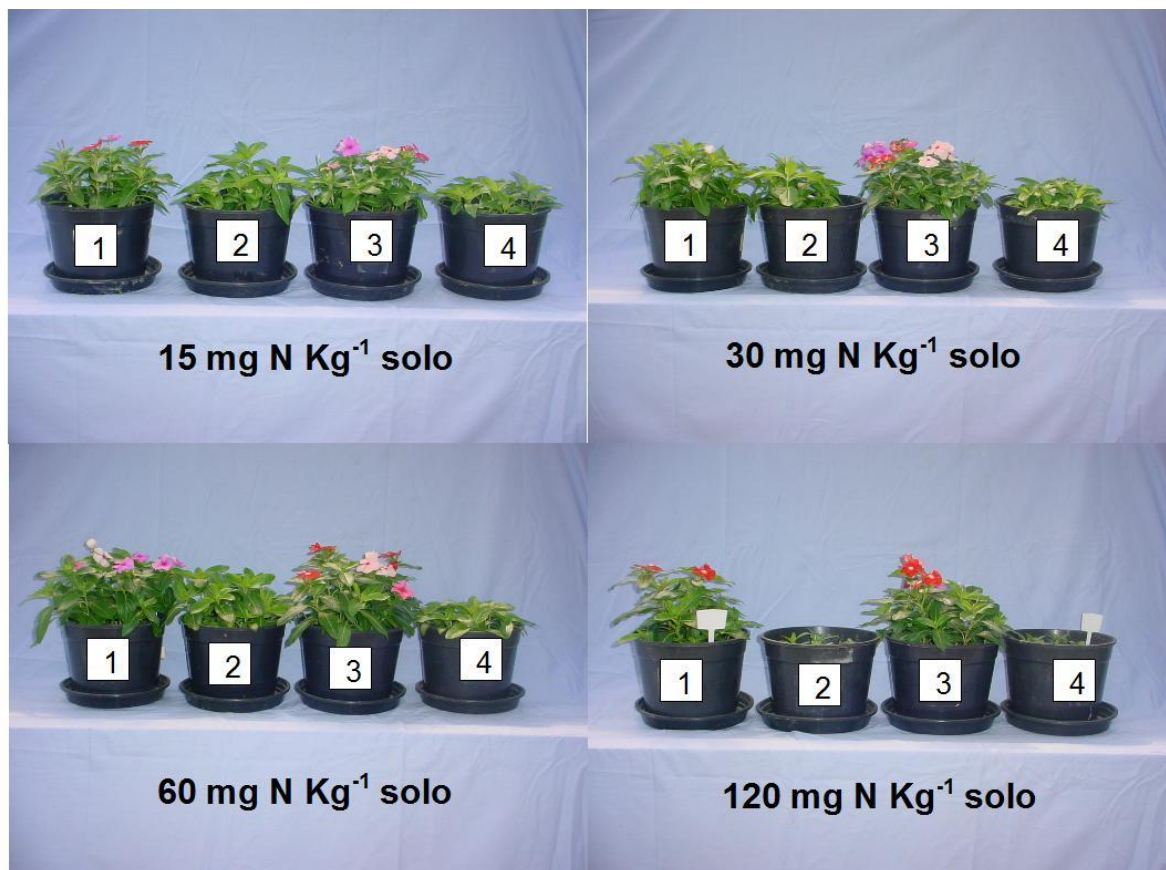
31

32

33

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

APÊNDICE



11 **Figura 1:** Vaso 1 = Tratamento com *Glomus etunicatum*, Vaso 2 = Tratamento
12 com *Glomus intraradices*, Vaso 3 = Tratamento com inóculo misto e
13 Vaso 4 = Tratamento sem fungo
14



1 **Figura 2:** Vaso 1 = tratamento sem fungo, Vaso 2 = tratamento com inoculo misto
2 e Vaso 3 = tratamento com *Glomus etunicatum*
3