



ESTRESSE HÍDRICA E SEUS EFEITOS NO DESENVOLVIMENTO INICIAL E ATIVIDADE BIOQUÍMICA EM CANA-DE-AÇÚCAR COM A DUPLA INOCULAÇÃO DE *MELOIDOGYNE INCOGNITA* E FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

Carmem Cristina Mareco de Sousa Pereira¹, Elvira Maria Regis Pedrosa², Mario Monteiro Rolim², Uided Maaza Tibúrcio Cavalcante³ e João Valdenor Pereira Filho⁴.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar efeitos da interação estresse hídrico (100% e 50% da capacidade do vaso) × *Meloidogyne incognita* × FMA (fungos micorrízicos arbusculares) no desenvolvimento vegetativo, produção de biomassa, multiplicação do fungo e do nematoide, bem como a atividade fisiológica da cana-de-açúcar variedade RB863129. Tanto o estresse hídrico como o *M. incognita* diminuíram o desenvolvimento vegetativo e a produção de biomassa fresca e seca da cana-de-açúcar enquanto os FMA contribuíram para o aumento da biomassa fresca do colmo e raiz. O estresse hídrico e o parasitismo por *M. incognita* proporcionaram redução nas concentrações de ascorbato peroxidase na cana-de-açúcar, mas o nematoide contribuiu para o aumento nas concentrações de polifenoloxidase e de proteína solúvel na planta. A associação micorrízica proporcionou aumento nos teores de P no colmo, apenas nas plantas mantidas com 100% da capacidade de pote. Os níveis das enzimas catalase e peroxidase e do aminoácido prolina não foram alterados pelo estresse hídrico, *M. incognita* e/ou FMAs, 45 dias após a inoculação do nematoide.

Palavras-chaves: *Saccharum*, *Claroideoglossum etunicatum*, *Gigaspora rosea*, *Acaulospora longula*, *Fuscutata heterogama*.

STRESS AND ITS EFFECTS ON WATER DEVELOPMENT AND INITIAL BIOCHEMISTRY ACTIVITY IN CANE SUGAR WITH DOUBLE MELOIDOGYNE INCOGNITA OF INOCULATION AND ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate effects of the interaction water stress (100 and 50% of the vase capacity) × *M. incognita* × AMF (arbuscular mycorrhizal fungi) in vegetative

¹ Doutora em Engenharia Agrícola pela UFRPE, e-mail: crismareco@hotmail.com

² Professores Associados pela UFRPE, e-mails: elvira.pedrosa@deagri.ufrpe.br; rolim@deagri.ufrpe.br.

³ Professora Visitante pela UFPE, e-mail: uided@yahoo.com.br.

⁴ Doutor Professor de EMI pelo CENTEC, e-mail: joao_valdenor@hotmail.com

development, biomass production, the fungi multiply and nematode, and physiological of sugarcane activity RB863129 variety. Both the water stress as *M. incognita* decreased the vegetative development and the production of fresh and dry biomass of sugarcane while the AMF contributed to the increase in fresh weight of stem and root. Water stress and parasitism by *M. incognita* provided reduction in ascorbate peroxidase concentrations in sugarcane, but the nematode contributed to the increase in polyphenol concentrations and soluble plant protein. The mycorrhizal association provided an increase in the P content in the stem, only on plants held 100% of the pot capacity. The levels of catalase and peroxidase enzymes and amino acid proline were not affected by water stress, *M. incognita* and / or AMF, 45 days after inoculation of the nematode.

Keywords: *Saccharum*, *Claroideoglosum etunicatum*, *Gigaspora rosea*, *Acaulospora longula*, *Fuscutata heterogama*.

INTRODUÇÃO

A água é um importante fator na distribuição das espécies nos diferentes ecossistemas. Durante o ciclo de vida, as plantas cultivadas estão sujeitas à deficiência hídrica e a associação com fungos micorrízicos arbusculares (FMA) pode ser uma alternativa para mitigar os efeitos do estresse hídrico sobre o crescimento das plantas (FARIAS et al., 2008).

Vários estudos têm evidenciado que a redução de crescimento devido à infecção por nematoides tem sido menor em plantas colonizadas por FMA quando comparadas às plantas não micorrizadas (SILVA et al., 2009).

Já os nematoides afetam drasticamente o sistema radicular das plantas causando rachaduras nas raízes, galhas, necroses que impedem a absorção de água e nutrientes pela planta, culminando com a diminuição da produção, podendo levá-las à morte (KRZYZANOWSKI et al., 2011). Embora não sejam conhecidos os mecanismos responsáveis pela supressão de nematoides das galhas nas raízes de diversas plantas micorrizadas, sabe-se que isso ocorre em resposta sistêmica da planta por mecanismos locais (ABALLAY et al., 2013).

A utilização de microrganismos como aprimoramento tecnológico, com a finalidade de melhorar a disponibilidade de nutrientes às plantas, é uma prática potencialmente importante e necessária para diversas culturas (TEIXEIRA et al., 2010). O objetivo deste estudo foi avaliar efeitos da interação estresse

hídrico × nematoides de galhas × FMA no desenvolvimento vegetativo, produção de biomassa fresca e seca, reprodução dos nematoides e na atividade fisiológica da cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.).

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-Pernambuco (8° 01' 05" latitude sul, 34° 56' 48" longitude oeste e altitude de 4 metros) com temperatura máxima de 36,7°C e mínima de 23,8°C e umidade relativa do ar mínima de 56,76% e máxima de 77,38%, de setembro a dezembro de 2011.

Foram utilizados vasos com capacidade volumétrica de 10 litros, e preenchidos com solo do tipo Argissolo amarelo distrófico, textura franco arenosa, coletado no Município de Carpina, Pernambuco, na camada de 0,5 – 0,9 m, com as seguintes características: pH (H₂O) = 4,6; Ca²⁺ = 0,37 cmol_c kg⁻¹; Mg²⁺ = 0,51 cmol_c kg⁻¹; Na⁺ = 0,03 cmol_c kg⁻¹; K⁺ = 0,04 cmol_c kg⁻¹; H⁺ + Al³⁺ = 2,84 cmol_c kg⁻¹; Al³⁺ = 0,91 cmol_c kg⁻¹; S = 0,95 cmol_c kg⁻¹; T = 4,70 cmol_c kg⁻¹; C = 7,0 g kg⁻¹; N = 0,3 g kg⁻¹; M.O. = 23 g kg⁻¹; P Assimilavel = 8 mg kg⁻¹; e K = 0,04 mg dm³. O solo foi inicialmente passado em peneira (5 mm), autoclavado (120 °C, pressão de 101 kPa), duas vezes, durante 1 hora e 30 min, com intervalo de 24 h, e utilizado 30 dias após a desinfestação.

As plântulas micro propagadas de cana-de-açúcar, variedade RB863129, foi cedida

ESTRESSE HÍDRICA E SEUS EFEITOS NO DESENVOLVIMENTO INICIAL E ATIVIDADE BIOQUÍMICA EM CANA-DE-AÇÚCAR COM A DUPLA INOCULAÇÃO DE *MELOIDOGYNE INCOGNITA* E FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

pela biofábrica do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE/MCTI). Após 20 dias de aclimação em substrato, na casa de vegetação, as plantas foram transplantadas para os vasos contendo solo. O experimento foi conduzido em delineamento experimental de blocos ao acaso em esquema fatorial de 2 (com e sem FMA) × 2 (com e sem nematoide) × 2 (com e sem estresse hídrico) e seis repetições.

Os FMA utilizados foram: *Acaulospora longula* Spain & N.C. Schenck (URM FMA 07), *Claroideoglossum etunicatum* (W.N. Becker & Gerd.) C. Walker & A. Schübler (URM FMA 03), *Fuscutata heterogama* Oehl, F.A. Souza, L.C. Maia & Sieverd. (URM FMA 04) e *Gigaspora rosea* T.H. Nicolson & N.C. Schenck (URM FMA 01) do Banco de Inóculo do Laboratório de Micorrizas do Departamento de Micologia da UFPE. A multiplicação dos FMA foi realizada, separadamente, em vasos com 3 kg de solo esterilizado em autoclave a 120 °C durante 1 hora e 30 minutos, por dois dias consecutivos. Como plantas multiplicadoras dos FMA foram utilizadas, em mistura, painço (*Panicum miliaceum*), milho (*Zea mays*), girassol (*Helianthus annuus*) e sorgo (*Sorghum bicolor*), em um ciclo de três meses, após o que os glomerosporos foram extraídos utilizando a técnica de peneiramento úmido (GERDEMANN; NICOLSON, 1963) seguido de centrifugação (1.048 g) em água e sacarose (JENKINS, 1964) e os glomerosporos contados em placas.

Após 20 dias de aclimação, em casa de vegetação, as mudas de cana-de-açúcar foram inoculadas com solo inóculo contendo, aproximadamente, 200 esporos planta⁻¹ consistindo da mistura, nas mesmas proporções, das quatro espécies de FMA, depositados na região das raízes.

Para o estresse hídrico foram usados tratamentos com 100 e 50% da capacidade do vaso (CV). A CV foi adotada como o conteúdo de água retirada pelo solo após sofrer saturação e consequente ação da gravidade, até o cessamento da drenagem, segundo Souza et al. (2000). A irrigação dos vasos foi controlada através do procedimento de pesagem diária, em

balança de precisão com sensibilidade de 1 g, entre 7 e 9 horas da manhã, seguido da reposição da água evapotranspirada no período e mantendo os vasos próximos à capacidade de campo. Nos tratamentos de estresse, a irrigação foi reduzida para 50% da capacidade do pote, iniciada no 30º dia após a inoculação com os FMA.

O nematoide de galhas (*Meloidogyne incognita*) foi obtido em campo cultivado com cana-de-açúcar e as progênies, oriundas de massa de ovos, foram mantidas e multiplicadas em tomateiro (*Solanum lycopersicum*) e em plantas de pimentão (*Capsicum annuum*), em solo autoclavado. A confirmação da espécie foi fundamentada na técnica de eletroforese de isoenzimas e o inóculo, ovos a partir de raízes parasitadas, foi obtido segundo Hussey & Barker (1973). A inoculação foi efetuada com aproximadamente 12.000 ovos mL⁻¹ planta⁻¹, 30 dias após a inoculação com FMA, usando-se pipetas de graduação automática, sendo a suspensão de ovos vertida em orifícios no solo ao redor da planta.

O experimento foi encerrado 45 dias após a inoculação dos nematóides. O crescimento morfológico foi avaliado aos 95 dias, com mensurações realizadas com auxílio de trena e paquímetro. Para a avaliação da matéria fresca e seca, as amostras coletadas foram armazenadas em sacos de papel, pesadas antes e depois da secagem em estufa com circulação de ar forçada (65°C, por 72 horas). Após a secagem, as amostras foram moídas e acondicionadas em sacos de polietileno e determinados o P (fósforo) utilizando o método de Miyazawa et al. (1984) e o N (nitrogênio) segundo a metodologia descrita pela Association of Official Analytical Chemists – AOAC (1990), no Laboratório de Química Vegetal da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Para facilitar a remoção do sistema radicular, visando à obtenção dos dados nematológicos, os vasos foram colocados em tanque com água, por alguns minutos e, cuidadosamente removidos, de modo a minimizar as perdas de massa de ovos das plantas. Foram realizadas três lavagens em cada

sistema radicular, passando-os em água limpa, em baldes. O sistema radicular foi removido, o peso da matéria fresca determinado e, com ajuda de uma lupa, foi realizada a contagem das galhas e calculado o índice de galhas (HUSSEY; BARKER, 1973). Em seguida, as raízes foram cortadas em segmentos de 1 cm e agitadas durante três minutos em solução de hipoclorito de sódio 0,5% para extração dos ovos, seguida da contagem em lâmina de Peter's com auxílio de microscópio (HUSSEY; BARKER, 1973).

Os esporos dos fungos micorrízicos arbusculares foram extraídos de alíquotas de 50 g de solo utilizando as técnicas de peneiramento úmido e centrifugação em água e sacarose, referidas anteriormente. As raízes foram diafanizadas em KOH (10%) e H₂O₂ (10%), coradas com azul de Trypan (0,05%) (PHILLIPS; HAYMAN, 1970), cortadas em 100 segmentos de 1 cm (GIOVANNETTI; MOSSE, 1980) que foram montados e observados em lâminas de vidro e, utilizando microscópio óptico, foi feita a estimativa da colonização micorrízica.

Para as análises bioquímicas, foi utilizada a 3ª folha de cada planta que depois de retirada foi submersa em nitrogênio líquido e armazenada em freezer até o processamento. O extrato das amostras foi preparado pela homogeneização de 0,1 g de matéria fresca em 4 mL do tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH

6.5) e, posteriormente, adicionado 0,05 g de polivinilpirrolidona (PVP). O homogenato foi centrifugado a 10.000 × g a 4 °C por 10 minutos (ZERAİK et al., 2008) e realizadas análises das enzimas: catalase (BERRS; SIZER, 1952), ascarbato peroxidase (NAKANO; ASADA, 1981), polifenoxidase (KAR; MISHRA, 1976), peroxidase (FATIBELHO-FILHO; VIEIRA, 2002) e proteínas solúveis totais (BRADFORD, 1976). Para análise do aminoácido prolina foi preparado um extrato utilizando 0,1 g de matéria fresca em 5 mL de ácido sulfosalicílico a 3%. O homogenato foi centrifugado por 10 minutos a 2.000 g e passado em papel de filtro n° 2 e determinados os teores de prolina (BATES et al., 1973).

Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando o programa estatístico SAS, com níveis de significância de 5% de probabilidade, pelo teste F e quando significativas, as médias foram submetidas ao teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram observadas interações entre estresse hídrico, *M. incognita* e FMA para as variáveis relacionadas ao desenvolvimento vegetativo e produção de biomassa fresca e seca da cana-de-açúcar (Tabela 1).

ESTRESSE HÍDRICA E SEUS EFEITOS NO DESENVOLVIMENTO INICIAL E ATIVIDADE BIOQUÍMICA EM CANA-DE-AÇÚCAR COM A DUPLA INOCULAÇÃO DE *MELOIDOGYNE INCOGNITA* E FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

Tabela 1 - Resumo da análise de variância do comprimento do colmo (ALT), diâmetro do colmo (DIAM), número de folhas (NF), número de perfilhos (NP), biomassa fresca das folhas (BFF), biomassa fresca do colmo (BFC), biomassa fresca total (BFT), matéria seca das folhas (MSF), matéria seca do colmo (MSC), matéria seca total (MST), biomassa fresca das raízes (BFR), número de galhas nas raízes (NG), número de ovos do nematóide (OVOS), número de esporos de FMA no solo (FMA-S) e taxa de colonização por FMA nas raízes (FMA-R) da cana-de-açúcar variedade RB863129, na interação estresse hídrico (E) × *Meloidogyne incognita* (N) × FMA, 45 dias após a inoculação do nematoide, em casa de vegetação.

Fonte de variação	GL	Quadrados médios														
		ALT	DIAM	NF	NP	BFF	BFC	BFT	MSF	MSC	MST	BFR	NG	OVOS	FMA-S	FMA-R
E	1	2950,97 ^{ns}	0,18*	0,032 ^{ns}	0,11 ^{ns}	6,7*	8902,6 ^{ns}	9397,4*	0,09*	1,06 ^{ns}	0,58 ^{ns}	3640,7*	0,25 ^{ns}		1,82*	0,85*
N	1	81,67*	0,001 ^{ns}	2,77 ^{ns}	0,33 ^{ns}	107,2 ^{ns}	448,5 ^{ns}	117,2*	0,02*	0,00002*	0,005*	259,4 ^{ns}	18,08*	199,14*	5,57 ^{ns}	1,92 ^{ns}
FMA	1	5,53 ^{ns}	0,19 ^{ns}	0,84 ^{ns}	0,22 ^{ns}	839,9 ^{ns}	1392,8*	4395,7 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,11 ^{ns}	1651,6*	0,15*	0,083*	243,99*	10,61*
E×N	1	135,83 ^{ns}	0,077 ^{ns}	0,27 ^{ns}	0,78 ^{ns}	0,2 ^{ns}	2,3 ^{ns}	3,7 ^{ns}	0,04 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,02 ^{ns}	276,1 ^{ns}	0,25 ^{ns}	0,077 ^{ns}	0,34 ^{ns}	0,45 ^{ns}
E×FMA	1	11,47 ^{ns}	0,016 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,026 ^{ns}	129,4 ^{ns}	747,8 ^{ns}	1499,2 ^{ns}	0,001 ^{ns}	0,00001 ⁿ	0,0001 ⁿ	268,4 ^{ns}	0,000001 ^{ns}	0,005 ^{ns}	1,82*	0,85*
N×FMA	1	134,59 ^{ns}	0,018 ^{ns}	2,95 ^{ns}	0,14 ^{ns}	103,0 ^{ns}	371,2 ^{ns}	865,3 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,001 ^{ns}	283,6 ^{ns}	0,15*	0,083*	5,57 ^{ns}	1,92 ^{ns}
E×N×FMA	1	104,49 ^{ns}	0,049 ^{ns}	0,31 ^{ns}	1,11 ^{ns}	117,6 ^{ns}	8,4 ^{ns}	188,7 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,0003 ^{ns}	0,003 ^{ns}	13,8 ^{ns}	0,000002 ^{ns}	0,0046 ⁿ	0,34 ^{ns}	0,45 ^{ns}
Resíduo	41	89,25	0,033	1,19	0,33	114,0	435,8	844,1	0,01	0,07	0,03	92,3	0,016	0,012	0,88	0,29
CV (%)	-	21,45	13,45	17,85	31,85	17,61	23,69	19,53	9,52	21,13	12,25	22,83	20,85	5,48	41,53	45,38

* significativo ao nível de 5% de probabilidade; ns - não significativo pelo teste F

O estresse hídrico diminuiu significativamente ($P < 0,05$) o diâmetro do colmo, a biomassa fresca da raiz e total e matéria seca da folha (Tabela 2). Os resultados corroboram com os encontrados por Santos (2012) que verificou, com 40% CV, redução de

35% no diâmetro do colmo, em relação ao suprimento hídrico normal (100% CV) em cana-de-açúcar não parasitada e, redução na matéria seca da parte aérea e na matéria seca total nas plantas parasitadas ou não com *M. incognita*.

Tabela 2 – Efeito do estresse hídrico no diâmetro do colmo (DIAM), biomassa fresca das folhas (BFF), biomassa fresca da raiz (BFR), biomassa fresca total (BFT) e matéria seca das folhas (MSF) em cana-de-açúcar variedade RB863129, em casa de vegetação.

Estresse hídrico	DIAM (cm)	BFF (g)	BFR (g)	BFT (g)	MSF (g)
Com (50% CV)	1,11b	56,46b	36,28b	139,21b	11,65b
Sem (100% CV)	1,39a	64,83a	47,88a	158,35a	14,74a
DMS	0,24	6,23	5,61	16,96	2,19

As letras diferentes apresentam médias diferentes significativamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O nematoide diminuiu significativamente ($P < 0,05$) a altura da planta, biomassa fresca total e as matérias secas do

colmo, folhas e total (Tabela 3), corroborando Guimarães et al. (2010) em cana-de-açúcar inoculada com *M. incognita*.

Tabela 3 – Efeito de *Meloidogyne incognita* no comprimento do colmo (ALT), biomassa fresca total (BFT), matéria seca do colmo (MSC), matéria seca das folhas (MSF) e matéria seca total (MST) da cana-de-açúcar variedade RB863129 em casa de vegetação.

<i>M. incognita</i>	ALT (cm)	BFT (g)	MSC (g)	MSF (g)	MST (g)
Com	36,33b	134,37b	15,51b	11,69b	27,20b
Sem	47,99a	162,77a	31,19a	14,69a	45,89a
DMS	8,23	16,96	8,46	2,19	9,05

As letras diferentes apresentam médias diferentes significativamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

COM – refere-se a presença de nematóides; SEM – refere-se a ausência de nematóide.

Segundo Dias-Arieira et al. (2010), o comportamento de diferentes variedades de cana-de-açúcar é variável no campo e nem sempre os maiores números de nematóides refletem em redução nos parâmetros vegetativos da planta.

Os FMAs aumentaram significativamente ($P < 0,05$) a biomassa fresca do colmo (de 74,52 para 101,76 g) e da raiz (de 36,28 para 47,88 g), corroborando Russomanno et al. (2008) em manjerição, onde a biomassa fresca da raiz obteve aumento de 93,10 % quando inoculada com FMA, quando comparado ao controle (resultados não demonstrados). Resultados contrários ao de Silva et al. (2009) que em mudas de maracujazeiro amarelo não observaram diferença significativa no diâmetro das plantas inoculadas com *G. albida* e *S. heterogama*.

De acordo com Farias et al. (2008) as hifas micorrízicas aumentam a área de absorção

radicular, permitindo melhor aproveitamento de água e nutrientes, proporcionando, assim, um crescimento mais rápido das plantas. Isso confere, também, maior resistência a estresse hídrico e patógenos do sistema radicular contribuindo para o estabelecimento e crescimento das plantas, mesmo em solos pobres em nutrientes ou degradados.

Houve interação entre estresse hídrico e FMA em relação à população de FMA no solo e raiz (Tabela 1) de forma que o estresse hídrico aumentou significativamente a colonização de FMA no solo e na raiz (Tabela 4). Esses resultados corroboram Amorim et al. (2004) em estudos com aroeira e umbu que observaram diferenças significativas entre os manejos de água para as culturas quando colonizadas por micorrizas. Os autores afirmam que o FMA autóctones mostram-se sensíveis aos manejos de água. Esses resultados são contrários aos de Farias et al. (2008) que não

ESTRESSE HÍDRICA E SEUS EFEITOS NO DESENVOLVIMENTO INICIAL E ATIVIDADE BIOQUÍMICA EM CANA-DE-AÇÚCAR COM A DUPLA INOCULAÇÃO DE *MELOIDOGYNE INCOGNITA* E FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

observaram eficiência micorrízica em comportamento se deve a pouca plantas de moringa submetidas a estresse afinidade entre o colonizador e o hídrico e, segundo os autores, esse hospedeiro.

Tabela 4 – Efeito da interação entre estresse hídrico e fungos micorrízicos arbusculares (FMA) na colonização das raízes por FMA (FMA-R) e número de esporos de FMA no solo (FMA-S) em cana-de-açúcar variedade RB863129, em casa de vegetação.

Estresse hídrico	FMA-R (% colonização raízes)		FMA-S (nº esporos 10 g solo ⁻¹)	
	FMA		Com	Sem
	Com	Sem		
Com (50% CV)	4,50 aA	0,00 aB	2,27 aA	0,00 aB
Sem (100% CV)	1,42 bA	0,00 aB	1,91 bA	0,00 aB
DMS	1,89		0,19	

Letras diferentes apresentam médias diferentes significativamente para cada variável pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade, sendo que as letras minúsculas refere-se à linha e as letras maiúsculas refere-se à coluna. CV = capacidade do pote, segundo Souza et al. (2000).

A restrição da disponibilidade hídrica na estação seca induz a manifestação de mecanismos de adaptação dos FMA, como a elevação da esporulação (BONFIM et al. 2010). Conforme é observado na Tabela 4, o estresse hídrico de 50 % da CV contribuiu para o aumento na esporulação (19%) e na colonização por FMA (217%) nas raízes das plantas de cana-de-açúcar.

Os FMA interagiram com *M. incognita* nas raízes da cana-de-açúcar reduzindo o número de galhas em 48,99% e o número de ovos em 68,39% (Tabelas 1 e 5). Resultados

semelhantes foram obtidos por Anjos et al. (2010) ao avaliarem a interação *S. heterogama* × *M. incognita* em maracujazeiro-doce com redução de 72% no número de galhas e 87,7% no número de ovos e nos estudos de correlação observaram correlação positiva entre a taxa de colonização das raízes e números de esporos de FMA × número de galhas e número de massas de ovos por grama de raiz. Entretanto, o aumento do vigor da cultura proporcionado pelo FMA, também ajuda a planta a suportar o parasitismo do nematoide (ANJOS et al., 2010).

Tabela 5 - Efeito da interação fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e *Meloidogyne incognita* no número de galhas nas raízes (NG) e número de ovos do nematoide (OVOS) em cana-de-açúcar variedade RB863129, em casa de vegetação, Recife – PE, 2011

FMA	NG		OVOS	
	<i>M. incognita</i>		<i>M. incognita</i>	
	Com	Sem	Com	Sem
Com	12,33 bA	0,00 aB	10.537,50 bA	0,00 aB
Sem	25,17 aA	0,00 aB	15.408,33 aA	0,00 aB
DMS	5,18		2.803,63	

Letras diferentes apresentam médias diferentes significativamente para cada variável pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade, sendo que as letras minúsculas refere-se à linha e as letras maiúsculas refere-se à coluna.

Ademais, Teixeira et al. (2010) relatam que os FMA e os nematoides parasitas de plantas podem estar simultaneamente associados às raízes, motivo pelo qual deve ser

considerado o efeito combinado dos dois grupos de organismos sobre o desenvolvimento da planta. Os autores afirmam, também que as interações entre planta, nematoide, FMA e

demais organismos da rizosfera, bem como os mecanismos envolvidos nesses processos, apresentam elevada complexidade, daí a necessidade de estudos integrados. Segundo Forge et al. (2001), as combinações FMAs \times nematoide \times hospedeiro favorecem a supressão da reprodução do patógeno e o aumento da tolerância da planta aos efeitos do nematoide. Cardozo e Araújo (2011) afirmam que o controle biológico da meloidoginose em cana-

de-açúcar é uma alternativa promissora para compor programas de controle integrado do parasito no solo.

Não houve interação entre estresse hídrico, *M. incognita* e FMA para as variáveis enzimas, proteínas solúveis totais, prolina e teores de fósforo nas folhas e no colmo da cana-de-açúcar. Interação entre estresse hídrico e FMA foi significativa para os teores de fósforo no colmo (Tabela 6).

Tabela 6 – Resumo da análise de variância das enzimas catalase (CAT), peroxidase (POD), ascorbato peroxidase (APX), polifenoxidase (PPO), proteína solúvel (PS), do aminoácido prolina (PRO) e dos teores de fósforo das folhas (PF) e do colmo (PC) da cana-de-açúcar variedade RB863129, na interação estresse hídrico (E) \times *Meloidogyne incognita* (N) \times FMA, 45 dias após a inoculação do nematoide, em casa de vegetação.

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios							
		CAT	POD	APX	PPO	PS	PRO	PF	PC
E	1	0,12 ^{ns}	3,56 ^{ns}	9397,4*	0,09 ^{ns}	1,06 ^{ns}	0,58 ^{ns}	3640,7*	20,15 ^{ns}
N	1	0,11 ^{ns}	0,31 ^{ns}	117,2*	0,02*	0,00002*	0,005 ^{ns}	259,4 ^{ns}	0,24 ^{ns}
FMA	1	0,24 ^{ns}	0,01 ^{ns}	4395,7 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,11 ^{ns}	1651,6 ^{ns}	10,16 ^{ns}
E \times N	1	0,07 ^{ns}	0,01 ^{ns}	3,7 ^{ns}	0,04 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,02 ^{ns}	276,1 ^{ns}	98,75 ^{ns}
E \times FMA	1	0,02 ^{ns}	747,8 ^{ns}	1499,2 ^{ns}	0,001 ^{ns}	0,00001 ^{ns}	0,0001 ^{ns}	268,4 ^{ns}	31,38*
N \times FMA	1	0,29 ^{ns}	371,2 ^{ns}	865,3 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,001 ^{ns}	283,6 ^{ns}	144,5 ^{ns}
E \times N \times FMA	1	0,06 ^{ns}	8,4 ^{ns}	188,7 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,0003 ^{ns}	0,003 ^{ns}	13,8 ^{ns}	0,13 ^{ns}
Resíduo	41	0,04	435,8	844,1	0,01	0,07	0,03	92,3	10,02
CV (%)	-	13,85	23,69	19,53	9,52	21,13	12,25	22,83	22,98

* significativo ao nível de 5% de probabilidade; ns - não significativo pelo teste F

Esses resultados discordam de outros estudos, a exemplo de Blilou et al. (2000), que observaram aumentos das atividades de catalase e ascorbato peroxidase em tabaco aos 3 e 5 dias após a inoculação com *Glomus mosseae*. Contudo, os autores afirmam que é possível que a indução de atividades de catalase e ascorbato peroxidase nas raízes micorrizadas seja resultado de estresse oxidativo causado pela colonização por FMA. Santos et al. (2010) constataram que apesar da enzima peroxidase apresentar variações, quando o feijoeiro caupi foi submetido a estresse hídrico não ocorreu diferença significativa, corroborando com os resultados obtidos nesta pesquisa.

Missiura (2005) e Kohatsu (2010) relata que enzimas oxidativas, como a peroxidase, podem ser indicadoras do estresse sofrido pela planta em função da infecção de patógenos ou

estresses ambientais. Fato que não ocorreu nesta pesquisa, já que a POD não houve efeito significativo ($P < 0,05$) em nenhuma das interações avaliadas.

Moratelli et al. (2007), avaliando a *T. avellanadae* sob estresse hídrico, observou que a baixa disponibilidade hídrica, independentemente do tipo de FMA inoculados (*G. clarum* e *G. etunicatum*), mostraram aumento significativo na quantidade do aminoácido prolina em relação às plantas não-estressadas, resultados contrários ao da pesquisa em questão.

Santo (2011), estudando mutantes de tomates inoculadas com FMA, observou baixíssimas alterações na atividade da enzima catalase, quando comparado ao controle.

Segundo Santos (2012), tanto o estresse hídrico como o parasitismo de nematoides de

ESTRESSE HÍDRICA E SEUS EFEITOS NO DESENVOLVIMENTO INICIAL E ATIVIDADE BIOQUÍMICA EM CANA-DE-AÇÚCAR COM A DUPLA INOCULAÇÃO DE *MELOIDOGYNE INCOGNITA* E FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

galhas podem influenciar negativamente na fisiologia da cultura da cana-de-açúcar. Alguns trabalhos (CARNEIRO et al., 2011; VIANA et al., 2012) com soja e milho, girassol e milho, sob diferentes níveis de estresse salino e hídrico, verificaram que as enzimas oxidativas, principalmente ascorbato peroxidase não

apresentaram níveis significativos com a aplicação dos estresses.

No presente estudo, a presença de *M. incognita* diminuiu significativamente ($P < 0,05$) a enzima ascorbato peroxidase, mas aumentou ($P < 0,05$) as concentrações de polifenolixidase e de proteína solúvel (Tabela 7).

Tabela 7 - Efeito de *Meloidogyne incognita* nos valores médios das enzimas ascorbato peroxidase (APX) e polifenolixidase (PPO) e de proteína solúvel (PS) em cana-de-açúcar variedade RB863129 em casa de vegetação.

<i>M. incognita</i>	APX (mmol H ₂ O ₂ gMF ⁻¹ min ⁻¹)	PPO (mmol Pirogalol gMF ⁻¹ min ⁻¹)	PS (mg PS gMF ⁻¹)
Com	36,99b	78,80a	11,19a
Sem	44,09a	68,80b	6,25b
DMS	5,32	8,51	2,13

As letras diferentes apresentam médias diferentes significativamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. COM – refere-se a presença de nematóides; SEM – refere-se a ausência de nematóides.

Estudos bioquímicos, envolvendo proteínas solúveis e enzimas oxidativas, têm demonstrado a importância no manejo de culturas submetidas a estresses bióticos e abióticos.

Segundo Sbalcheiro et al. (2009), a interação planta-patógeno envolve mecanismos bioquímicos de defesa da planta contra o patógeno, os quais são regidos por genes específicos.

Tabela 8 - Efeito da interação entre estresse hídrico e fungos micorrízicos arbusculares (FMA) nos teores de fósforo no colmo (PC) da cana-de-açúcar variedade RB863129, em casa de vegetação.

Estresse Hídrico	PC (g kg MS ⁻¹)	
	FMA	
	Com	Sem
Com (50% CV)	12,57 bA	13,39 aA
Sem (100% CV)	16,13 aA	13,00 aB
DMS	2,97	

Letras diferentes apresentam médias diferentes significativamente para cada variável pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade, sendo que as letras minúsculas refere-se à linha e as letras maiúsculas refere-se à coluna.

Os FMA aumentaram ($P < 0,05$) o teor de P no colmo da cana-de-açúcar apenas na ausência do estresse hídrico (Tabela 8). De acordo com a literatura (NAGY et al., 2005), os mecanismos envolvidos na maior absorção de P pela planta micorrizada ainda não estão totalmente esclarecidos, atribuindo-se em parte, ao aumento da área de absorção promovido pela hifa e/ou maior expressão e afinidade dos transportadores de P da hifa fúngica.

Segundo Carneiro et al. (2004), níveis altos de P no solo inibem a

colonização dos FMA nas plantas. No presente trabalho isso não ocorreu, pois a análise do solo evidenciou 8 mg kg⁻¹ de P. Tal fato evidencia ser a sucessão destes dois tipos de associações (teor de P + FMA) influenciada pelas condições ambientais (estresse hídrico). Os benefícios das associações micorrízicas para as plantas, quando evidenciados, resultam no aumento da absorção de P.

CONCLUSÕES

Tanto o estresse hídrico como o parasitismo de *M. incognita* diminuem o desenvolvimento vegetativo e a produção de biomassa fresca e seca dada cana-de-açúcar variedade RB863129. Ao contrário, os FMAs induzem aumentos na biomassa fresca do colmo e raiz.

O estresse hídrico favorece a esporulação e a colonização das raízes por FMA, contribuindo para a redução do número de galhas e de ovos de *M. incognita* nas raízes.

Tanto o estresse hídrico como o parasitismo de *M. incognita* diminuem as concentrações de ascorbato peroxidase na cana-de-açúcar, entretanto a infecção promovida pelo nematoide aumenta as concentrações de polifenoloxidase e de proteína solúvel na planta.

O estresse hídrico reduz os teores de P das folhas da cana-de-açúcar enquanto os FMAs aumentam os teores de P no colmo, contudo o aumento de P promovido pelos FMAs não ocorre sob estresse hídrico.

Os níveis das enzimas catalase e peroxidase e do aminoácido prolina não são afetados pelo estresse hídrico, *M. incognita* e/ou FMAs 45 dias após a inoculação do nematoide.

AGRADECIMENTOS

A FACEPE pelo apoio financeiro a pesquisa.

LITERATURA CITADA

- ABALLAY, R. S.; ORDENES, P.; MÄRTENSSON, A.; PERSSON, P. Effects of rhizobacteria on parasitism by *Meloidogyne ethiopia* on grapevines. **European Journal of Plant Pathology**, v. 135, n. 1, p. 137-145, 2013.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official Methods of Analysis**. 1990. In: EUA. 15 ed., Washington: D. C., 1117p.
- AMORIM, S. M. C.; PAIM, A. C. B.; SILVA, M. G. Efeito do déficit hídrico sobre a colonização endomicorrízica em duas espécies fungos micorrízicos arbusculares em cafeeiros vegetais típicas da região semi-árida do Nordeste. **Revista de Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.33, p.23-26, 2004.
- ANJOS, E. C. T. dos; CAVALCANTE, U. M. T.; GONÇALVES, D. M. C.; PEDROSA, E. M. R.; SANTOS, V. F. dos; MAIA, L. C. Interactions between the arbuscular mycorrhizal fungus (*Scutellospora heterogama*) and the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on sweet passion fruit (*Passiflora alata*). **Brazilian Archives of Biology Technology**, v. 53 n. 4, p. 801-809, 2010.
- BATES, L.S.; WALTREN, R.B.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water - stress studies. **Plant and Soil**, v.39, n. 1, p.205-207, 1973.
- BERRS, L.S.J.; SIZER, I.W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 195, p. 133-140, 1952.
- BLILOU, I.; OCAMPO, J.; GARCIA-GARRIDO, J. Induction of catalase and ascorbate peroxidase activities in tobacco roots inoculated with arbuscular mycorrhizal *Glomus mosseae*. **Mycological Research**, v.104, n. 6, p. 722-725, 2000.
- BONFIM, J. A.; MATSUMOTO, S. N.; LIMA, J. M.; CÉSAR, F. R. C. F.; SANTOS, M. A. F. Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e aspectos fisiológicos em cafeeiros cultivados em sistema agroflorestal e a pleno sol. **Bragantia**, v. 69, n. 1, p. 201-206, 2010.
- BRANDÃO, J. A. C.; CAVALCANTE, U. M. T.; PEDROSA, E. M. R.; MAIA, L. C. Interação entre fungos micorrízicos arbusculares e *Pratylenchus coffeae* na produção de mudas de graviola (*Annona muricata*). **Nematologia Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 27-33, 2004.

ESTRESSE HÍDRICA E SEUS EFEITOS NO DESENVOLVIMENTO INICIAL E ATIVIDADE BIOQUÍMICA EM CANA-DE-AÇÚCAR COM A DUPLA INOCULAÇÃO DE *MELOIDOGYNE INCOGNITA* E FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

- BRANDFORD, M. **Analytical Biochemistry**, 72, p. 248-254, 1976.
- CARDOZO, R. B.; ARAÚJO, F. F. de. Multiplicação de *Bacillus subtilis* em vinhaça e viabilidade no controle da meloidoginose, em cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, n. 12, p. 1283-1288, 2011.
- CARNEIRO, M. M. L. C.; DEUNER, S.; OLIVEIRA, P. V. de; TEXEIRA, S. B.; SOUSA, C. P.; BACARIN, M. A.; MORAES, D. M. de. Atividade antioxidante e viabilidade em sementes de girassol após estresse hídrico e salino. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 4, p. 754-763, 2011.
- DIAS-ARIEIRA, C. R.; SANTOS, D. A.; SOUTO, E. R.; BIELA, F.; CHIAMOLERA, F. M.; CUNHA, T. P. L. da; SANTANA, S. de A.; PUERARIL, H. H. Reação de variedades de cana-de-açúcar aos nematóides-das-galhas. **Nematologia Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 198-203, 2010.
- FARIAS, S. G. G. de; FREIRA, A. L. de O.; SANTOS, D. R. dos; SILVA, R. B. e; FREIRA, J. L. de O. Resposta de plantas de moringa (*Moringa oleifera* Lam.) inoculadas com fungos micorrízicos e submetidas ao estresse hídrico. **Engenharia Ambiental**, v. 5, n. 3, p. 36-46, 2008.
- FATIBELHO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, v.25, n.3, p.455-464, 2002.
- FORGE, T.; MUEHLCHEN, A.; HACKENBERG, C.; NEILSEN, G.; VRAIN, T. Effect of preplant inoculation of apple (*Malus domestica* Borkh) with arbuscular mycorrhizal fungi on population growth of the root-lesion nematode, *Pratylenchus penetrans*. **Plant and Soil**, v. 236, n. 2, p. 185-196, 2001.
- GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, v.46, n.2, p. 235-244, 1963.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, v. 84, p. 489-500, 1980.
- HUSSEY, R. S. & BARKER, K. R. A comparison of methods of collecting inocula for *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v. 57, n.12, p. 1025-1028, 1973
- JENKINS, W. R. A. Rapid centrifugal flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, v. 48, n. 6, p. 692, 1964.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v. 57, n. 3, p. 315 – 319, 1976.
- KOHATSU, D. S. **Aspectos fisiológicos e bioquímicos da enxertia em plantas de pepino**. 2010. 68p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2010.
- KRZYZANOWSKI, A. A. **Controle biológico de nematoides de galha do cafeeiro com fungos nematófagos**. 2006. 60 p. Tese (Doutorado) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jabotical, 2006.
- KRZYZANOWSKI, A. A.; BALOTA, E. L.; MARIANOWSKI, T.; SILVA, S. A.; DORIGO, O. F.; GARDIANO, C. G. Potencial de controle biológico de *Meloidogyne paranaensis* utilizando fungos nematófagos e fungos micorrízicos em planta de café. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS

- CAFÉS DO BRASIL, 7. **Anais...** Axará: MG, CD-ROM, 2011.
- MAIA, A. S.; SANTOS, J. M. dos; DI MAURO, A. O. Estudo *in vitro* da habilidade predatória de *Monacrosporium robustum* sobre *Heterodera glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 732-736, 2001.
- MISIURA, F. B. **Alterações metabólicas promovidas pelo Papaya Ringspot virus – type W em plantas de melancia**. 2005. 69p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2005.
- MIYAZAWA, M.; PAVAN, M. A.; BLOCH, M. F. M. Avaliação de métodos com e sem digestão para extração de elementos em tecidos de plantas. **Ciência e Cultura**, v.36, n. 11, p.1953-1958, 1984.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, n. 8, p. 867–880, 1981.
- NAGY, R.; KARANDASHOV, V.; CHAGUE, V.; KALINKEVICH, K.; TAMASLOUKHT, M.; XU G.; JAKOBSEN, I.; LEVY, A.A.; AMRHEIN, N.; BUCHER, M. The characterization of novel mycorrhiza-specific phosphate transporters from *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum* uncovers functional redundancy in symbiotic phosphate transport in solanaceous species. **Plant Journal**, v. 42, n. 2, p. 236–250, 2005.
- PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, v.55, n. 1, p. 157-161, 1970.
- SANTO, V. B. R. D. **Respostas das plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) com superexpressão da H⁺ pirofosfatase à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares**. 2011. 68p. Dissertação (Mestrado) – Centro Universitário Vila Velha, Vila Velha, 2011.
- SANTOS, T. E. B. dos; NAKAYAMA, F. T.; ARF, O.; CASSIOLATO, A. M. R. Alterações microbiológicas, de fertilidade e de produtividade do arroz de terras altas em diferentes manejos de solo e água. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 30, n. 2, p. 203-209, 2008.
- SANTOS, C. F.; LIMA, G. P. P.; MORGADO, L. B. Tolerância e caracterização bioquímica em feijão caupi submetido a estresse hídrico na pré-floração. **Naturalia**, v. 33, p. 34-44, 2010.
- SBALCHEIRO, C. C.; DENARDIN, N. D.; BRAMMER, S. P. Alterações de isoenzimas peroxidases em plantas de feijoeiro tratadas com biocontrolador do crestamento bacteriano comum. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 1, p. 029-037, 2009.
- SILVA, T. F. B.da; SANTOS, A. B. da S.; ROZAS, C. E. da O.; SANTOS, A. C. dos; PAIVA, L. M. Influência da densidade de fungos micorrízicos arbusculares na produção do maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis). **Revista Caatinga**, v. 22, n. 4, p. 1-6, 2009.
- SOUZA, C.C.; OLIVEIRA, F. A.; SILVA, I. F.; AMORIM NETO, M. S. Avaliação de métodos de determinação de água disponível e manejo da irrigação em terra roxa sob cultivo de algodoeiro herbáceo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.4, n.3, p.338-342, 2000.
- TEIXEIRA, E. M.; ROCHA, L. C. D.; MACHADO, T. de F.; PEREIRA, J. de M.; CHOIFI, F. M.; MORAIS, V. S. de P. Ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares, nematóide e ácaro em solos sob diferentes sistemas de cultivo cafeeiro no sul de Minas Gerais. **Revista Agrogeoambiental**, p. 101-108, 2010.

ESTRESSE HÍDRICA E SEUS EFEITOS NO DESENVOLVIMENTO INICIAL E ATIVIDADE BIOQUÍMICA EM CANA-DE-AÇÚCAR COM A DUPLA INOCULAÇÃO DE *MELOIDOGYNE INCOGNITA* E FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

ZERAIK, A. E.; SOUZA, F. S.; FATIBELHO-FILHO, O.; LEITE, O. D. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade

da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**, v. 31, p. 731-734, 2008.