

LYDICE SANT' ANNA MEIRA HADDAD

**EFEITO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES SOBRE O
PARASITISMO DO NEMATÓIDE DAS GALHAS EM PLANTAS DE
BANANEIRA MICROPROPAGADAS**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia
Agrícola, para obtenção do título de
Doctor Scientiae.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LYDICE SANT' ANNA MEIRA HADDAD

**EFEITO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES SOBRE O
PARASITISMO DO NEMATÓIDE DAS GALHAS EM PLANTAS DE
BANANEIRA MICROPROPAGADAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de julho de 2008.

Prof. Maurício Dutra Costa
(Co-Orientador)

Prof. Wagner Campos Otoni
(Co-Orientador)

Prof^a. Francilina Araújo Costa

Prof. Leandro Grassi de Freitas

Prof. Maria Catarina Megumi Kasuya
(Orientadora)

BIOGRAFIA

LYDICE SANT'ANNA MEIRA HADDAD, filha de Nice Sant'Anna Meira e José Lydio Meira, nasceu no dia 11 de dezembro de 1976 em Sete Lagoas, no estado de Minas Gerais.

No ano de 2002, concluiu o curso de Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa e, em agosto do mesmo ano, iniciou o curso de Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa (UFV), obtendo-se o título de *Magister Scientiae* em 2004.

Em agosto de 2004, iniciou o curso de Doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola na UFV, submetendo-se a defesa em 28 de julho de 2008.

“Se enxerguei mais longe, foi por estar apoiada sobre ombros de gigantes”

(Isaac Newton)

DEDICATÓRIA

Ao meu amado filho Arthur, presente Divino e diário.

Ao meu grande companheiro, amor e amigo, Fernando.

Aos meus pais Nice e José Lydio: origem, alicerce, princípios e amor.

*Ao meu pai, José Lydio Meira
Ofereço*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Maria Catarina Megumi Kasuya, pela orientação científica e profissional, exemplo de dedicação, que jamais será esquecido, pela confiança em mim depositada por todos esses anos e pela grande amizade.

Ao Professor Maurício Dutra Costa pela amizade, contribuição e pelas valiosas sugestões.

Ao Professor Wagner Campos Otoni que sempre acreditou em mim e em meu trabalho, sempre incentivando e auxiliando em etapas críticas.

À amiga e Professora Francilina Araújo Costa, pela grande amizade, pelos valiosos ensinamentos e pelas sugestões deste trabalho.

Ao Professor Leandro Grassi de Freitas pelas sugestões, apoio e incentivo para a realização desse trabalho.

Ao Professor Dalmo Lopes de Siqueira pela doação do material vegetal.

Ao meu marido, Dr. Fernando Haddad, pelo incentivo, apoio, compreensão e amor.

Aos meus pais, Nice e José Lydio, pelo apoio, carinho e amor.

Ao meu irmão, tios, tias, primos, primas, amigos, afilhados, sogro e sogra pelo apoio e compreensão.

À amiga Gilmara Duarte Pereira pela nossa preciosa amizade e companheirismo em todos os momentos.

Ao Bruno Coutinho Moreira pela amizade, auxílio, paciência, e grande dedicação durante a realização deste trabalho.

Ao Ubiratan e à Ana Lúcia pela ajuda e disposição durante a condução de parte dos experimentos.

Aos grandes amigos, Professor Marlon Corrêa Pereira e Marliane Soares da Silva pela amizade, excelente convívio e pelas valiosas conversas.

Aos amigos do Laboratório de Associações Micorrízicas Adalberto Akihiko, Andréa, André, André Carvalho, André Marcos, André Narvaes, Cidinha, Cristiane, Daniela, Daniele, Denise, Fernanda, João Júlio, José Maria,

Laélia, Mateus, Melissa, Muriel, Ozias, Priscila, Sabrina, Saulo, Tiago, Tomás, Vinícius, pelas seções de humor, pela convivência e pela amizade.

À Dr^a. Rosângela Dallemole Giareta pelo auxílio em todas as etapas do trabalho com o patógeno e pela amizade formada a partir desta convivência diária.

A todos os Professores do Departamento pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento, em especial, Danilo, Evandro, Júlio, Sr. Toninho, Nilcéia e Laura pelo auxílio e convivência.

À Universidade Federal de Viçosa, em particular o Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realizar o curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de estudo e aprovação do projeto.

SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
INTRODUÇÃO GERAL.....	01
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	10

CAPÍTULO I

Cultura dixênica do fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum* e o nematóide das galhas (*Meloidogyne incognita*) e atividade enzimática de raízes de cenoura (*Daucus carota*) transformadas

RESUMO.....	17
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
2.1. Raízes de cenoura transformadas.....	22
2.2. Cultura monoxênica de <i>Glomus clarum</i>	22
2.3. Cultura monoxênica de <i>Meloidogyne incognita</i>	23
2.4. Cultura dixênica de <i>Glomus clarum</i> e <i>Meloidogyne incognita</i>	24
2.5. Atividade enzimática em raízes de cenoura transformada.....	25
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
3.1. Cultura monoaxênica de <i>Meloidogyne incognita</i>	28
3.2. Cultura dixênica de <i>Glomus clarum</i> e <i>Meloidogyne incognita</i>	32
3.3. Atividade enzimática em raízes de cenoura transformada.....	38
4. CONCLUSÕES.....	43
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

CAPÍTULO II

**Aclimatização de plantas de bananeira micropropagada micorrizadas
*in vitro***

RESUMO.....	50
1. INTRODUÇÃO.....	51

2. MATERIAL E MÉTODOS.....	55
2.1. Material vegetal e cultivo <i>in vitro</i>	55
2.2. Cultura monoaxênica de <i>Glomus clarum</i>	56
2.3. Sistema de cultivo tripartite <i>in vitro</i>	56
2.4. Aclimatização das plantas.....	58
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	60
3.1. Sistema de cultivo tripartite <i>in vitro</i>	60
3.2. Aclimatização das plantas.....	65
4. CONCLUSÕES.....	72
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

CAPÍTULO III

Efeito protetor do fungo micorrízico arbuscular (*Glomus clarum*) aos nematóides das galhas (*Meloidogyne incognita*) em bananeiras micropropagada

RESUMO.....	79
1. INTRODUÇÃO.....	80
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	85
2.1. Material vegetal e cultivo <i>in vitro</i>	85
2.2. Cultura monoxênica de FMA.....	86
2.2. Inóculo do nematóide.....	86
2.3. Efeito de <i>Glomus clarum</i> no controle de <i>Meloidogyne incognita</i> em mudas de bananeira micropropagada em casa de vegetação.....	86
2.4. Sistema de compartimentalização de raízes de bananeira micropropagada inoculada com <i>Glomus clarum</i> e ou <i>Meloidogyne incognita</i>	88
2.5. Análises enzimáticas em sistema de compartimentalização de raízes de bananeira micropropagada inoculada com <i>Glomus clarum</i> e <i>Meloidogyne incognita</i>	91

3. RESULTADOS.....	93
3.1. Efeito de <i>Glomus clarum</i> em mudas de bananeira micropropagada no controle de <i>Meloidogyne incognita</i> em casa de vegetação.....	93
3.2. Sistema de compartimentalização de raízes de bananeira micropropagada inoculada com <i>Glomus clarum</i> e <i>Meloidogyne incognita</i>	95
3.3. Análises enzimáticas em sistema de compartimentalização de raízes de bananeira micropropagada inoculada com <i>Glomus clarum</i> e <i>Meloidogyne incognita</i>	99
4. DISCUSSÃO.....	105
5. CONCLUSÕES.....	110
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
 CONCLUSÕES GERAIS.....	 116

RESUMO

HADDAD, Lydice Sant' Anna Meira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2008. **Efeito de fungos micorrízicos arbusculares sobre o parasitismo do nematóide das galhas em plantas de bananeira micropropagadas.** Orientadora: Maria Catarina Megumi Kasuya. Co-orientadores: Maurício Dutra Costa e Wagner Campos Otoni.

A bananeira é uma das fruteiras de maior importância econômica e a sua micropropagação vem sendo estimulada para garantir produção de mudas de qualidade. Entretanto, elas são susceptíveis a muitas doenças e pragas, incluindo os nematóides. Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são simbioses obrigatórios que se associam às raízes de plantas favorecendo o crescimento e o desenvolvimento de plantas, podendo também, protegê-las contra ataques de patógenos do solo. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da inoculação de *Glomus clarum* sobre o parasitismo do nematóide das galhas em plantas de bananeiras micropropagadas. Inicialmente, obtiveram-se culturas monoxênicas de *Meloidogyne incognita* em raízes de cenoura transformada (RT), onde pôde ser observada a reprodução do mesmo. Posteriormente, estabeleceu-se a cultura dixênica de *Glomus clarum* e *M. incognita* em RT e foi observada uma redução no número de galhas de *M. incognita* quando raízes estavam associadas a *G. clarum*. As atividades de peroxidase (PO) e fenilalanina amônia liase (PAL), avaliadas aos 0, 1, 4 e 7 dias após a inoculação do nematóide foram aumentadas na presença do FMA e do nematóide. Em uma segunda etapa, estabeleceu-se o sistema tripartite de micorrização *in vitro*, em duas cultivares de bananeira micropropagadas (Prata-anã e FHIA 01). Plantas foram enraizadas em meio de cultura, *in vitro*, e transferidas para recipientes contendo substrato (solo:vermiculita, 2:1)

esterilizado e, no momento da transferência, foram inoculadas com o FMA produzido *in vitro*. Este sistema tripartite foi acondicionado em embalagens de polipropileno com filtro bacteriológico, e incubados em sala de crescimento. Ao final de 50 dias todas as plantas sobreviveram e apresentaram cerca de 30 % de colonização micorrízica. A associação com FMA proporcionou maior crescimento e desenvolvimento das plantas. Na terceira e última etapa, avaliou-se o efeito protetor do fungo sobre o *M. incognita* em plantas de bananeira micropropagadas. Plantas de bananeiras foram enraizadas em meio de cultura, *in vitro*, aclimatizadas e transferidas para casa de vegetação. Utilizando-se o sistema de compartimentalização de raízes, fungos e/ou nematóides foram inoculados no mesmo ou em compartimentos diferentes. O número de galhas e de ovos de nematóides foi reduzido somente quando o FMA foi inoculado no mesmo compartimento. As atividades de PO e PAL aumentaram na presença do fungo e do nematóide. Conclui-se que os FMAs beneficiam o crescimento e o desenvolvimento das bananeiras micropropagadas, e que o FMA tem efeito localizado sobre o nematóide e compensam os danos causados por esse patógeno.

ABSTRACT

HADDAD, Lydice Sant'Anna Meira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2008. **Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the root-knot nematode parasitism in micropropagated banana plantlets.** Adviser: Maria Catarina Megumi Kasuya. Co-advisers: Maurício Dutra Costa and Wagner Campos Otoni.

Banana is one of the most economically important fruits crops and its micropropagation has been stimulated by improving seedlings quality. However, they are sensitive to many pests and pathogens, including nematodes. The arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are symbionts associated to the roots, favoring the growth and the development of plants, also being able to protect the plants against pathogens. This work aimed to evaluate the effect of the inoculation of *Glomus clarum* on the parasitism of the nematode on micropropagated banana plantlets. Initially, monoaxenic culture of *Meloidogyne incognita* was obtained in transformed carrot roots (TR), where the reproduction of the pathogens could be observed. Subsequently, the dixenic culture of *Glomus clarum* and *M. incognita* was established in RT and reduction in the number of nematodes root galls when roots were colonized by *G. clarum* was observed. The activities of peroxidase (PO) and phenylalanine- ammonia liase (PAL), evaluated at 0, 1, 4 and 7 days after nematodes inoculation increased in the presence of both FMA and nematode. In a second stage, the tripartite system of *in vitro* mycorrhization was established, using two varieties of micropropagated banana (Prata-Anã and FHIA 01). *In vitro* rooted banana plantlets were transferred to containers with autoclaved substrate (soil:vermiculite, 2:1) and, at the moment of the transfer, inoculated with *G. clarum*. This tripartite system was conditioned in polypropylene bags with

bacteriologic filter, and incubated in growth chamber. After 50 days, all the plants survived and the colonization was around 30 %. The association with FMA provided greater growth and development of the plants. In third and last stage, the protective effect of AMF on *M. incognita* on the micropropagated banana plantlets was investigated. Banana's plantlets derived from the rooting media, were acclimatized and transferred to greenhouse. Split-roots system was used in which, AMF and nematode eggs were inoculated in the same or different compartments. The total number of root-knot and nematode eggs was reduced only when the AMF was inoculated in the same compartment. The activities of PO and PAL increased in the presence of the fungus and the nematode. It was concluded that AMF benefit the growth and the development of the micropropagated banana plantlets and FMA present localized effect on nematode compensating the damage caused by these pathogens.

INTRODUÇÃO GERAL

A banana, no ano de 2005, foi a fruta mais produzida no mundo, representando, 105 milhões de toneladas. Na produção brasileira de fruticultura a banana é superada em volume apenas pela laranja e, apresenta-se, como de grande importância por ser o Brasil o maior consumidor mundial, mesmo sendo o segundo em produção com 6.99 milhões de toneladas (FAO, 2005; MAPA, 2008). Encontra-se distribuída por todo o território nacional e os estados de São Paulo, Bahia, Santa Catarina, Pará e Minas Gerais são os maiores produtores e respondem por 67% da produção brasileira (FAO, 2005; Instituto FNP, 2007).

A bananeira e seus frutos são afetados com grande intensidade por problemas fitossanitários, que representam grandes prejuízos e inviabilizam o cultivo em algumas áreas. Dentre os patógenos da bananeira, os nematóides das galhas (*Meloidogyne* spp.) merecem destaque especial devido à frequência com que ocorrem, à intensidade dos danos causados e à ampla disseminação no Brasil e no mundo (Waele & Davide, 1998; Costa et al., 1998). As galhas formadas afetam o sistema radicular e impedem absorção de água e nutrientes e os sintomas presentes na parte aérea nem sempre são visíveis. Entretanto, alta população desse nematóide no solo, oportuniza a entrada de outros patógenos cujos danos ocorridos são mais visíveis e, consequentemente, quantificados, e com isto os danos do *Meloidogyne* spp. passam despercebidos (Waele & Davide, 1998).

Os nematóides são disseminados através da comercialização indiscriminada de mudas infestadas entre os bananicultores e a maioria das cultivares plantadas são suscetíveis aos nematóides (Waele & Davide, 1998;

Vilas Boas et al., 2002). Após o seu estabelecimento no bananal, o seu controle é dificultado uma vez que, o controle químico, mediante o uso de nematicidas, pode não ser viável economicamente em áreas infestadas, inviabilizando sua adoção, além de ser tóxico ao homem e ao meio ambiente (Barros et al., 2000).

As mudas têm papel fundamental na qualidade fitossanitária do bananal, uma vez que, nematóides e outros patógenos são disseminados pelas mesmas. De acordo com a aprovação da Instrução Normativa 17 de 31 de maio de 2005 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2005), o trânsito de mudas atualmente só é permitido se estas forem provenientes de áreas livres da doença Sigatoka Negra causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* e que as mudas sejam micropropagadas e provenientes de matrizes livres de pragas e doenças.

Atualmente, uma das ferramentas biotecnológicas disponíveis para o estabelecimento dessas exigências normativas, é o uso da cultura de tecidos para manter e estabelecer tecidos e órgãos vegetais sadios em condições axênicas. Dentro da cultura de tecidos, a micropropagação tem sido empregada para a produção de mudas sadias em escala comercial (Leonel et al., 2004; Kapoor et al., 2008).

Entretanto, a técnica de micropropagação tem sido limitada para muitas espécies vegetais devido à baixa sobrevivência durante a fase de aclimatização (Kozai et al., 1991; Preece & Sutter, 1999) na qual ocorrem adaptações e correções das anormalidades estruturais e fisiológicas das plantas desenvolvidas *in vitro* (Wetzstein e Sommer, 1982; Preece e Sutter, 1991; Lemos et al., 2001).

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) Filo *Glomeromycota*, ordem *Glomerales* formam associações mutualistas com raízes de plantas. O grande interesse sobre essa simbiose deve-se ao grande número de espécies vegetais agrícolas em que ocorrem aos benefícios que trazem às plantas hospedeiras e à distribuição em vários habitats (Borges et al., 1997; Azcón-Aguilar & Barea, 1997; Berbara et al., 2006).

As micorrizas arbusculares melhoram o estado nutricional das plantas, ampliam a adaptação de plantas em diferentes ecossistemas, aumentam a tolerância a fatores de estresse biótico e abiótico. Isso reflete em aumento do vigor, sobrevivência e produtividade de plantas micropropagadas (Azcón-Aguilar & Barea, 1997; Yano-Melo et al., 1999; Costa, 2003).

O estabelecimento da associação micorrízica tem sido benéfico na fase de aclimatização de plantas micropropagadas (Hooker et al., 1994; Kapoor et al., 2008), proporcionando maior crescimento a várias espécies de plantas incluindo a bananeira (Azcón-Aguilar et al., 1992; Elmeskaoui et al., 1995; Yano-Melo et al., 1995; Schubert & Lubraco, 2000; Costa, 2003; Meira, 2004; Moraes et al., 2004). Esse crescimento está relacionado ao aumento da tolerância ao estresse, devido à maior absorção de água e nutrientes e às maiores taxas fotossintética e transpiratória e à maior condutância estomática das plantas associadas aos FMAs (Elmeskaoui et al., 1995; Yano-Melo et al., 1999; Costa, 2003; Estrada-Luna & Davies, 2003).

Para o sucesso da inoculação de plantas micropropagadas é importante selecionar não só a espécie de FMAs, mas também o tipo de inóculo a ser utilizado (Fortuna et al., 1998). Assim, uma das alternativas para a produção de propágulos viáveis, de alta qualidade, livre de contaminantes tem sido a

utilização de inóculos de FMAs produzidos monoxenicamente, em cultura de raiz (Diop et al., 1994; Declerck et al., 1996; St Arnaud et al., 1996; Costa, 2003). O uso desses FMAs para a inoculação de mudas micropropagadas, ainda no ambiente *in vitro*, é tecnicamente viável e permite estudos básicos da simbiose e produção de mudas colonizadas pelo fungo e, conseqüentemente, pré-adaptação para a aclimatização (Pons et al., 1983; Diop et al., 1994; Elmeskaoui et al., 1995; Declerck et al., 1996; Hernández-Sebastia et al., 1999; Kapoor et al., 2008).

Além dos efeitos nutricionais, da maior tolerância de plantas a condições de estresse biótico e abiótico, podem ser atribuídos, também, aos FMAs proteção das plantas contra danos causados por patógenos do solo, a exemplo, dos nematóides (Yano-Melo et al., 1999; Schubert & Lubraco, 2000; Costa et al., 1998; Estrada-Luna & Davies, 2003; Moraes et al., 2004; Meira, 2004; Hol & Cook, 2005; Elsen et al., 2008).

Os FMAs podem ser considerados como agentes de biocontrole (Azcón-Aguilar & Barea, 1996; Pozo et al., 2002) e tem tido recebido atenção por promoverem resistência e/ou tolerância, redução da incidência e severidade de doenças de plantas e redução do número de patógenos de solo (Cordier et al., 1998; Hol & Cook, 2005; Borges et al., 2007).

O sucesso do sistema de defesa vegetal contra patógenos depende primeiramente do reconhecimento e da invasão do patógeno nos estádios iniciais para ativação das cascatas de repostas de defesa. Plantas em simbiose micorrízica sofrem alterações bioquímicas, fisiológicas e moleculares relacionados com o sistema de defesa da planta para que a simbiose seja estabelecida (Garcia-Garrido & Ocampo, 2002). Entretanto, as respostas de

defesa da planta são limitadas, transientes e restritas a células específicas, mas as reações nas plantas têm semelhanças, do ponto de vista fisiológico, com as reações que se observam durante a colonização por patógenos (Gianinazii-Pearson, 1996; Garcia-Garrido & Ocampo, 2002; Lambais et al., 2003). A colonização micorrízica atua como sistema primário de defesa da planta ao ataque do patógeno (Elsen et al., 2008).

As mudanças fisiológicas na planta causada pelos simbiossiontes, previnem o ataque de patógeno e ativam mecanismos de defesa, uma vez que proteínas relacionadas com a patogênese, fitoalexinas e lignificação da parede celular têm sido relatadas em plantas micorrizadas em locais distantes dos sítios de infecção indicando, assim, a ocorrência de resistência sistêmica (Cordier et al., 1998; Pozo et al., 2002; Selosse et al., 2004).

Segundo Azcón-Aguilar & Barea (1996) entre os mecanismos de controle biológico de doenças de plantas promovidos por FMA podem ser citados: melhoria do estado nutricional da planta hospedeira, compensação do dano causado pelo patógeno, competição pelo sítio de infecção e sítio de colonização, mudanças anatômicas e morfológicas no sistema radicular do hospedeiro, mudanças na população microbiana da rizosfera e ativação de mecanismos de defesa que podem ser sistêmicos ou localizados (Pozo et al., 2002).

A inoculação antecipada de FMAs em mudas de bananeira, as quais são mais vulneráveis aos nematóides, pode conferir maior proteção e/ou tolerância e tornar-se manejo adequado contra nematóides, proporcionando benefícios para o crescimento e desenvolvimento das mudas (Pinochet et al., 1996; Pozo et al., 2002; Elsen et al., 2003). Tem sido constatado que a inoculação com

FMA aumenta o crescimento de plantas de bananeira micropropagada e, também, a tolerância aos nematóides, compensação do dano causado pelo nematóide, e, principalmente, nutrição da planta (Pinochet et al., 1996; Selosse et al., 2004).

Estresses bióticos e abióticos, por exemplo, promovidos por ataque de patógenos e alterações da planta na aclimatização alteram o metabolismo e induzem à mudanças no desenvolvimento dessas plantas, causando explosão oxidativa (De Gara et al., 2003). Durante o metabolismo aeróbico, o oxigênio molecular (O_2) é reduzido à água por 4 elétrons na cadeia transportadora de elétrons, e esse O_2 é relativamente não reativo e não tóxico devido sua estrutura estável, mas sua redução parcial gera intermediários transitórios, altamente reativos e danosos para a célula. Essa redução parcial do O_2 forma as espécies de oxigênio reativas (EOR), incluindo o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($OH^{\cdot}$) e, entre essas moléculas, pode ocorrer conversões tornando-se em espécies ainda mais reativas (Figura 1).

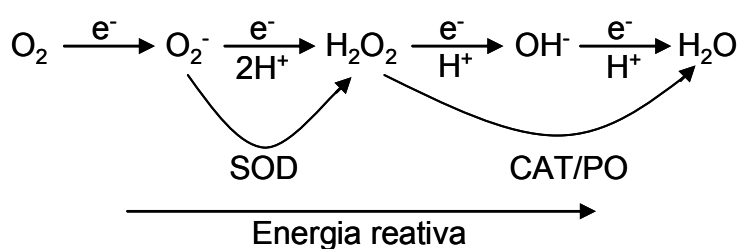


Figura 1: Fluxo de elétrons durante a explosão oxidativa e vias de detoxificação: oxigênio molecular (O_2), o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($OH^{\cdot}$), água (H_2O), enzima superóxido dismutase (SOD), enzima catalase (CAT), enzima peroxidase (PO), elétron (e^-) e hidrogênio (H^+).

As EOR ocorrem normalmente no metabolismo celular, porém, quando acumuladas tornam-se tóxicas às células ao reagirem com outras moléculas causando danos celulares (Hernandez et al., 2001; De Gara et al., 2003). As EOR causam consideráveis perdas de qualidade e produtividade vegetal devido ao excesso de produção de superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila que inativam macromoléculas diretamente ou reagem instantaneamente com proteínas, lipídios ou DNA causando danos celulares (del Río et al., 2006).

A célula dispõe das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), e peroxidase (PO) para detoxificar essas EOR (Figura 1) (De Gara et al., 2003). A enzima catalisadora SOD pode estar ligada a um metal (Cu/Zn, Mn e Fe) e está envolvida na reação de detoxificação do O_2^- em H_2O (Figura 1). A CAT e a PO, presentes nos peroxissomos e glioxissomos convertem o H_2O_2 em H_2O (Figura 1) (del Río et al., 2006).

As EOR têm várias funções na defesa vegetal, podendo atuar diretamente sobre o patógeno, inibindo seu desenvolvimento; fortalecer a parede celular, por favorecer as ligações cruzadas com proteínas estruturais; na peroxidação de lipídeos da membrana plasmática, fortalecendo sua integridade e na regulação da expressão de genes de defesa. Em associações micorrízicas as EOR atuam como mensageiro secundário e alterações no padrão das enzimas antioxidativas, como PO, estão relacionados com o desenvolvimento da simbiose (García - Garrido & Ocampo, 2002).

As plantas que aumentam a produção de enzimas antioxidantes, mostram-se mais tolerantes a diferentes estresses, e as micorrizas induzem ao aumento da atividade dessas enzimas (Alguacil et al., 2003; Costa, 2003;

Lambais et al., 2003; Selosse et al., 2004). Dessa forma, os FMAs podem aumentar a habilidade das plantas em resistir a estresses ambientais, por permitir uma maior tolerância às EOR, apesar do papel dessas enzimas em micorrizas serem pouco elucidado (Costa, 2003).

Além das EOR, as plantas também dispõem do metabolismo de fenilpropanóide que está relacionado como mecanismo de resistência sistêmica adquirida. Os compostos fenólicos apresentam diversas funções nos vegetais e a classe mais abundante é a derivada da fenilalanina, que por meio da eliminação de uma molécula de amônia forma o ácido *trans*-cinâmico. Essa reação é catalisada pela enzima fenilalanina amônia liase (PAL) que catalisa a primeira etapa da biossíntese de fenilpropanóide e o ácido *trans*-cinâmico formado é incorporado em diferentes compostos fenólicos que participam da defesa contra patógenos (De Gara et al., 2003; Arfaoui et al., 2007).

A PAL está situada em um ponto de ramificação entre os metabolismos primário e secundário, de forma que a reação que a essa enzima catalisa é uma etapa reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos. A indução da atividade PAL é relacionada com ferimentos causados por patógenos (De Gara et al., 2003; Arfaoui et al., 2007). A biossíntese de compostos fenólicos é um dos componentes da resistência à patógenos, existindo uma correlação entre níveis elevados e fenólicos com resistência ou resposta de plantas à infecção do patógeno. Plantas em interação com *Rhizobium* aumentam a expressão de genes que codificam as enzimas da via fenilpropanóide. Na resistência de plantas a nematóides, tem sido relatado aumento da atividade de PAL, acúmulo de peroxidase, superóxido dismutase (Arfaoui et al., 2007; Jaiti et al., 2007).

Todos esses benefícios promovidos pelos FMAs em plantas ainda não são bem elucidados devido à dificuldade de estudos por serem biotróficos obrigatórios. Dessa forma, o sistema de cultura para estabelecimento de micorriza *in vitro* em raízes de cenoura transformadas (Bécard & Fortin, 1988) pode ser usado como fonte de inóculo e, também, para estudos da associação bem como os mecanismos envolvidos na bioproteção de plantas contra patógenos. A vantagem do uso desse sistema *in vitro* de FMA-patógeno, inclui a ausência de efeito indesejável causado por contaminantes, eliminação da influência de competição por nutrientes e monitoramento detalhado dos eventos associados com o ataque de patógeno em raízes micorrízicas (Benhamou et al., 1994; Elsen et al., 2001).

O controle biológico pode ser método alternativo para manejo dos nematóides das galhas. A manipulação de populações de microrganismos habitantes comuns do solo associada às raízes é uma área de pesquisa promissora, podendo ser alternativa efetiva e durável no controle de doenças do sistema radicular de plantas. Microrganismos benéficos que promovem crescimento de plantas e apresentam efeito protetor contra patógenos do solo como os FMAs, são considerados de grande potencial para agente de biocontrole (Azcón-Aguilar & Barea, 1996; Cordier et al., 1998; Pozo et al., 2002).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alguacil, M. M.; Hernández, J. A.; Caravaca, F.; Portillo, B.; Roldán, A. Antioxidant enzyme activities in shoots from three mycorrhizal shrub species afforested in a degraded semi-arid soil. **Physiologia Plantarum**, 118: 562-570, 2003.
- Arfaoui, A.; El Hadrami, A.; Mabrouk, Y.; Sifi, B.; Boudabous, A.; El Hadrami, I.; Daayf, F.; Chérif, M. Treatment of chickpea with *Rhizobium* isolates enhances the expression of phenylpropanoid defense-related genes in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. **Plant Physiology and Biochemistry**, 45: 470-479, 2007.
- Azcón-Aguilar, C. & Barea, J. M. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. **Scientia Horticulturae**, 68:1-24. 1997.
- Azcón-Aguilar, C. & Barea, J. M. Arbuscular micorrizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved. **Mycorrhiza**, 6: 457-464, 1996.
- Azcón-Aguilar, C.; Barceló, A.; Vidal, M. T.; De la Vina, G. Further studies on the influence of mycorrhizae on growth and development of micropropagated avocado plants. **Agronomie**, 12:837-840, 1992.
- Barros, A. C. B.; Moura, R. M.; Pedrosa, E. M. R. Aplicação de terbufós no controle de *Meloidogyne incognita* raça 1 e *Pratylenchus zeae* em cinco variedades de cana-de-açúcar no Nordeste. **Nematologia Brasileira**, 24:73-78, 2000.
- Bécard, G. & Fortin, A. Early events of vesicular arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. **New Phytologist**, 108: 211-218, 1988.
- Benhamou, N.; Fortin, J. A.; Hamel, C.; St. Arnaud, M.; Shatila A. Resistance response of mycorrhizal Ri T-DNA transformed carrot roots to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*. **Phytopathology**, 84:958-968, 1994.

- Berbara, R. L. L.; Souza, F. A.; Fonseca, H. M. A. C. **Fungos micorrízicos arbusculares: muito além da nutrição**. In: Nutrição Mineral de plantas, 54-79, 2006.
- Borges, A. J. S.; Trindade, A. V.; Matos, A. P.; Peixoto, M. F. S. Redução do mal-do-panamá em bananeira-maçã por inoculação de fungo micorrízico arbuscular. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 42:35-41. 2007.
- Brasil. Instrução Normativa nº 17 de 31 de maio de 2005. Aprova os procedimentos para caracterização, implantação e manutenção de área livre de Sigatoka Negra e os procedimentos para implantação e manutenção do sistema de mitigação de risco para Sigatoka Negra – *Mycosphaerella fijiensis*. 2005. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em julho de 2008.
- Cordier, C.; Pozo, M. J.; Barea, J. M.; Gianinazzi, S.; Gianinazzi-Pearson V.; Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 11:1017-1028, 1998.
- Costa, D. da C.; Silva S. de O.; Alves, F.R. Reação de genótipos de bananeiras (*Musa* spp.) a *Radopholus similis* e *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Brasileira**, 22:49-57, 1998.
- Costa, F. A. **Micorrizas arbusculares e enzimas do estresse oxidativo em raízes de cenoura transformada e em morangueiro**. Viçosa: UFV, 2003. 92 p. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2003.
- De Gara, L.; Pinto, M. C.; Tommasi, F. The antioxidant systems vis-a-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. **Plant Physiology and Biochemistry**, 41:863–870, 2003.
- Declerck, S.; Strullu, D. G.; Plenchette, C. *In vitro* mass-production of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus versiforme*, associated with Ri T-DNA transformed carrot roots. **Mycological Research**, 100: 1237-1242, 1996.
- del Río, L. A.; Sandalio, L. M.; Corpas, F. J.; Palma, J. M.; Barroso, J. B. Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in Peroxisomes. Production, Scavenging, and Role in Cell Signaling. **Plant Physiology**, 141:330-335, 2006.

- Diop, T. A., Plenchette, C., Strullu, D. G. *In vitro* culture of sheared mycorrhizal roots. **Symbiosis**, 17: 217-227, 1994.
- Elmeskaoui, J. P.; Damont, M. J.; Poulin, Y.; Piché, Y.; Desjardins, Y. A tripartite culture system for endomycorrhizal inoculation of micropropagated strawberry plantlets *in vitro*. **Mycorrhiza**, 5: 313-319, 1995.
- Elsen, A.; Beeterens, R.; Swennen, R.; De Waele, D. Effects of an arbuscular mycorrhizal fungus and two plant-parasitic nematodes on *Musa* genotypes differing in root morphology. **Biology and Fertility of Soils**, 38:367–376, 2003.
- Elsen, A.; Declerck, S.; De Waele, D. Effects of *Glomus intraradices* on the reproduction of the burrowing nematode (*Radopholus similis*) in dioxenic culture. **Mycorrhiza**, 11:49-51, 2001.
- Elsen, A.; Gervasio, D.; Swennen, R.; De Waele, D. AMF-induced biocontrol against plant parasitic nematodes in *Musa* sp.: a systemic effect. **Mycorrhiza**, 18:251-256, 2008.
- Estrada-Luna, A. A. & Davies, J. F. T. Arbuscular mycorrhizal fungi influence water relations, gas exchange, abscisic acid and growth of micropropagated chile ancho pepper (*Capsicum annuum*) plantlets during acclimatization and post-acclimatization. **Journal of Plant Physiology**, 160: 1073-1083, 2003.
- FAO. FAOSTAT. Database results. 2005. Disponível em <<http://www.foa.org.br/>>. Acesso em julho de 2008.
- Fortuna, P.; Morini, S.; Giovannetti, M. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on *in vivo* root initiation and development of micropropagated plum shoots. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, 73:19-28, 1998.
- Garcia-Garrido, J. M. & Ocampo, J. A. Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Journal of Experimental Botany**, 53: 1377–1386, 2002.
- Gianinnazzi-Pearson, V. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting the roots of symbiosis. **The Plant Cell**, 8:1871-1883, 1996.
- Hernandez, J. A.; Talavera, J. M.; Martinez-Gomez, P.; Dicenta, F.; Sevilla F. response of antioxidative enzymes to plum pox virus in two apricot cultivars. **Plant Physiology**, 111:313-321, 2001.

- Hernández-Sebastia, C.; Piché, Y.; Desjardins, Y. Water relations of whole strawberry plantlets *in vitro* inoculated with *Glomus intraradices* in a tripartite culture system. **Plant Science**, 143:81-91, 1999.
- Hol, W.H. G. & Cook, R. An overview of arbuscular mycorrhizal fungi–nematode interactions. **Basic and Applied Ecology**, 6:489-503, 2005.
- Hooker, J. E.; Gianinazzi, S.; Vestberg, M.; Barea, J. M.; Atkinson, D. The applications of arbuscular mycorrhizal fungi to micropropagated systems: an opportunity to reduce inputs. **Agricultural Science**, 3:227-232, 1994.
- Instituto FNP. Agrianual 2007: Anuário da agricultura brasileira. São Paulo: Prol editora Gráfica, 516p. 2007.
- Jaiti, F. Meddich, A.; El Hadrami, I. Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi in the protection of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) against bayoud disease. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 71:166–173, 2007.
- Kapoor, R.; Sharma, D.; Bhatnagar, A. K. Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications. **Scientia Horticulturae**, 116:227–239, 2008.
- Kozai, T.; Ohde, N.; Kubota, C. Similarity of growth patterns between plantlets and seedlings of *Brassica campestris* L. under different *in vitro* environmental conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 24:181-186, 1991.
- Lambais, M. R.; Ríos-Ruiz, W. F.; Andrade, R. M. Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, 160:421-428, 2003.
- Lemos, E. E. P.; Ferreira, M. S.; Alencar, L. M. C.; Oliveira, J. G. L.; Magalhães, V. S. Micropropagação de clones de banana cv. Terra em biorreator de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 23:482-487, 2001.
- Leonel, S.; Gomes, E. M.; Pedroso, C. J. Desempenho agrônômico de bananeiras micropropagadas em Botucatu-SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 26:245-248. 2004.
- MAPA, 2008. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em julho de 2008.
- Meira, L. S. **Atividade de enzimas do estresse oxidativo em morangueiro micropropagado e inoculado com fungos micorrízicos arbusculares**

- durante a aclimatização.** Viçosa: UFV, 2004. 64 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2004.
- Moraes, R. M.; Andrade, Z.; Bedir, E.; Dayan, F. E.; Lata, H.; Khan, I.; Pereira, A. M. S. Arbuscular mycorrhizal improves acclimatization and increases lignan content of micropropagated mayapple (*Podophyllum peltatum* L.). **Plant Science**, 166:23-29, 2004.
- Pinochet, J. C.; Calvet, A.; Camprubi, C.; Fernandez. Interactions between migratory endoparasitic nematodes and arbuscular mycorrhizal fungi in perennial crops: a review. **Plant and Soil**, 185:183-190, 1996.
- Pons, F.; Gianinazzi-Person, V.; Gianinazzi, S.; Navavatel, J. C. Studies of VA mycorrhizae *in vitro*: mycorrhizal synthesis of axenically propagated wild cherry (*Prunus avium* L.) plants. **Plant and Soil**, 71:217-221, 1983.
- Pozo, M. J.; Cordier, C.; Dumas-Gaudot, E.; Gianinazzi, S.; Barea, J., M.; Azcón-Aguilar, C. Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defense responses *Phytophthora* infection in tomato plants. **Journal of Experimental Botany**, 53:525-534, 2002.
- Prece, J. E. & Sutter, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: Debergh, P. C.; Zimmerman, R. H. (Ed.). **Micropropagation, technology and application**. London: Kluwer Academic, 71-93, 1991.
- Schubert, A. & Lubraco, G. Mycorrhizal inoculation enhances growth and nutrient uptake of micropropagated apple rootstocks during weaning in commercial substrates of high nutrient availability. **Applied Soil Ecology**, 15:113-118, 2000.
- Selosse, M. A.; Baudoin, E.; Vandenkoornhuyse, P. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. **Compts Rendus Biologies**, 327: 639–648, 2004.
- ST-Arnaud, M., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M., Fortin, J. A. Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots. **Mycological Research**, 100: 328-332, 1996.

Vilas Boas, I. C.; Tenente, R. C. V.; Gonzaga, V.; Neto, S. P. S.; Rocha, H. S.
Reação de clones de bananeira (*Musa* spp.) ao nematóide *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, raça 2. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 24:690-693, 2002.

Waele, D. D. & Davide, R. G. **The Root-Knot Nematodes of Banana**. International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Parc Scientifique Agropolis. France. 1998.

Wetzstein, H. Y. & Sommer, H. E. Leaf anatomy of tissue-cultured *Liquidambar styraciflua* plantlets during acclimatization. Journal [of the American Society for Horticultural Science](#), 108:475-480, 1982.

Yano-Melo, A. M.; Júnior, O. J. S.; Lima-Filho, J. M.; Melo, N. F.; Maia, L. C.
Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the acclimatization of micropropagated banana plantlets. **Mycorrhiza**, 9:119-123, 1999.

CAPÍTULO I

Cultura dixênica do fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum* e o nematóide das galhas (*Meloidogyne incognita*) e atividade enzimática de raízes de cenoura (*Daucus carota*) transformadas

CAPÍTULO I

Cultura dixênica do fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum* e o nematóide das galhas (*Meloidogyne incognita*) e atividade enzimática de raízes de cenoura (*Daucus carota*) transformadas

RESUMO

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e o nematóide das galhas são obrigatoriamente dependentes da raiz para completo ciclo de vida. Ocupam o mesmo nicho na raiz, podendo ocorrer interações que podem interferir no desenvolvimento de um e de outro, direta ou indiretamente. Este trabalho teve como objetivo verificar a interação entre *Meloidogyne incognita* e *Glomus clarum* em raízes de cenoura transformadas. Para tal, ovos de *M. incognita* foram esterilizados superficialmente e aplicados em culturas de raízes de cenoura transformadas, em meio mínimo e incubados à 27 °C para determinação do ciclo de vida em cultura monoxênica. Ovos do nematóide foram aplicados em culturas monoxênicas de *G. clarum* e durante 80 dias de incubação à 28 °C, foram avaliados número de esporos, comprimento de hifas do FMA, ciclo de vida e número de galhas do nematóide nesta cultura dixênica. Ovos desinfestados superficialmente, foram aplicados em cultura monoxênicas do FMA e, também, só em raiz de cenoura transformada para determinação da atividade da peroxidase e fenilalanina amônia liase aos 0, 1, 4 e 7 dias após a aplicação desses ovos. A cultura monoxênica do nematóide foi obtida com sucesso, e foi possível observar o completo ciclo de vida com formação de galhas características e postura de massa de ovos. A cultura dixênica de *G. clarum* e *M. incognita* foi estabelecida e o número de esporos e comprimento de hifas não foram influenciados pela presença do nematóide, entretanto, o FMA reduziu o número de galhas do nematóide. A atividade de peroxidase e fenilalanina amônia liase apresentaram-se maiores nas raízes colonizadas pelo FMA e com a aplicação do nematóide, quando comparada somente com a raiz e a aplicação do nematóide. Concluímos que raízes transformadas podem ser consideradas como boas culturas para reprodução e manutenção de culturas axênicas de *M. incognita* permitindo completo ciclo de vida e que *G. clarum* e *M. incognita* são capazes de se estabelecerem em cultura dixênica, entretanto o número de galhas é afetado pelo FMA. O aumento da atividade das enzimas não pode ser atribuído somente ao FMA ou ao nematóide, nas condições estudadas.

Palavras-chave: micorriza arbuscular, cultivo *in vitro*, cultura monoxênica, cultura dixênica, nematóide, controle biológico, peroxidase e fenilalanina amônia liase.

1. INTRODUÇÃO

Dentre os fitopatógenos que determinam a produtividade das culturas, encontram-se os nematóides formadores de galhas, pertencentes ao gênero *Meloidogyne*, os quais constituem o grupo de maior importância econômica. O grande número de hospedeiros existentes e a interação com outros organismos patogênicos colocam os nematóides entre os principais patógenos responsáveis pela limitação da produtividade agrícola (Ritzinger et al., 2007).

Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) pertencem ao filo *Glomeromycota*, ordem *Glomerales* (Brundrett, 2002; Berbara et al, 2006). Esses simbiossiontes obrigatórios que associam com raízes de diversas espécies de plantas, promovem aumento no crescimento e na nutrição mineral do hospedeiro e atuam no controle de patógenos de solo (Azcón-Aguilar & Barea, 1996; Elsen et al., 2001, 2003; Elsen et al., 2008; Pozo et al., 2002).

Vários estudos têm mostrado que os FMAs afetam a reprodução dos nematóides por meio da redução da ovoposição, do número de indivíduos no sistema radicular de plantas infectadas, do número de galhas e podem, ainda, aumentar a tolerância das plantas ao ataque desses patógenos por reduzir o seu desenvolvimento (Elsen et al., 2003; Jaiti et al., 2008).

Populações de *Pratylenchus coffeae*, *Radophylus similis*, *Meloidogyne javanica*, entre outros, foram reduzidas por *Glomus mosseae* e *Glomus intraradices* quando associados às raízes de banana (Pinochet et al., 1996; Elsen et al., 2003). Os fungos micorrízicos podem ter efeito na reprodução do nematóide reduzindo galhas, ovos, inibindo a penetração, podem não ter efeito ou estimular a reprodução do nematóide (Siddiqui & Mahmood, 1995). Esses

diversos efeitos indicam que essa interação é específica e que o genótipo da planta, espécie do nematóide, isolado fúngico e alterações no ambiente podem explicar essas diferentes respostas (Siddiqui & Mahmood, 1995; Hol & Cook, 2005; Borges et al., 2007; Jaiti et al., 2008).

O sucesso do estabelecimento da micorriza é fundamental para o controle dos nematóides, apresentando efeito negativo sobre a reprodução desses organismos (Cordier et al., 1998; Elsen et al., 2001, 2003). Os mecanismos de controle biológico de doenças de plantas, promovidos pelos FMA podem ser a melhoria do estado nutricional da planta hospedeira, a compensação do dano causado pelo patógeno, a competição pelo sítio de infecção e sítio de colonização e a ativação de mecanismos de defesa (Azcón-Aguilar & Barea, 1996; Cordier et al., 1998; Pozo et al., 2002; Elsen et al., 2008).

O efeito bioprotetor dos FMAs aos patógenos de plantas pode estar relacionado com a indução de resistência de forma localizada ou sistêmica (Cordier et al., 1998; Pozo et al., 2002; Elsen et al., 2008). Quando colonizadas por FMAs, as plantas promovem alterações bioquímicas, fisiológicas e moleculares relacionados com o sistema de defesa da planta para que a simbiose seja estabelecida (Garcia-Garrido & Ocampo, 2002; De Gara et al., 2003; Selosse et al., 2004). Entretanto, as respostas de defesa da planta são limitadas, transientes e restritas a células específicas, mas as reações das plantas têm semelhanças, do ponto de vista fisiológico, com as reações que se observam durante a colonização por patógenos (Gianinazii-Pearson, 1996; Garcia-Garrido & Ocampo, 2002; Lambais et al., 2003). A colonização micorrízica atua como sistema primário de defesa da planta ao patógeno (Elsen

et al., 2008). Plantas com maiores atividades de enzimas antioxidantes mostram-se mais tolerantes a diferentes estresses, e as micorrizas induzem ao aumento da atividade das enzimas antioxidantes como peroxidase, catalase e superóxido dismutase (Costa, 2003; Lambais et al., 2003; Meira, 2004; Arfaoui et al., 2007).

A peroxidase é uma enzima que apresenta indução transitória da sua expressão, seguida de posterior supressão durante a colonização micorrízica. As peroxidases catalisam a polimerização oxidativa de fenilpropanóides para produção de lignina e estão envolvidas na ligação cruzada de proteínas da parede celular, contribuindo para o aumento da rigidez (Siddiqui & Mahmood, 1995; Hol & Cook, 2005; del Río et al., 2006). Dessa forma, o peróxido de hidrogênio tem papel importante no reforço da parede celular e indução sistêmica de genes de defesa (del Río et al., 2006).

Outra enzima também relacionada com mecanismos de defesa contra patógenos é a fenilalanina amônia liase, enzima-chave na rota dos fenilpropanóides, é responsável pela desaminação da L-fenilalanina, transformando-a em ácido *trans*-cinâmico e amônia. O ácido *trans*-cinâmico é incorporado em diferentes compostos fenólicos que dão origem a fitoalexinas, compostos antimicrobianos intimamente associadas à resistência de plantas a patógenos (Wuyts et al., 2006; Arfaoui et al., 2007).

O estudo dos mecanismos envolvidos na bioproteção dos FMAs aos nematóides tem sido limitado devido ao biotrofismo e ao parasitismo obrigatório de ambos. Entretanto, raízes de plantas transformadas geneticamente por *Agrobacterium rhizogenes* tem sido utilizada com sucesso para o estabelecimento de culturas monoxênicas *in vitro* de FMAs e de nematóides,

fornecendo material puro adequado para estudos básicos dessas interações (Bécard & Fortin, 1988; Verdejo et al., 1988, Declerck et al., 1996; Elsen et al., 2001; Fortin et al., 2002; Elsen et al., 2003).

Atualmente, foi descoberto que existem muitas espécies de *Glomerales* e de *M. javanica*, *Radopholus similis*, *Pratylenchus coffeae* que são capazes de se reproduzem em culturas de raízes transformadas por *A. rhizogenes* (Verdejo et al., 1988; Elsen, et al., 2001; Fortin et al., 2002; Costa, 2003; Elsen,et al., 2003; Declerck et al., 2002). A vantagem do uso desse sistema *in vitro* de FMA-nematóide, inclui a ausência de efeito indesejável causado por contaminantes, eliminação de influência de competição por nutrientes, mudanças microbiológicas na rizosfera, monitoramento detalhado dos eventos associados com o ataque do patógeno em raízes micorrízicas (Benhamou et al., 1994; Elsen et al., 2001).

Dessa forma, o objetivo do trabalho foi estabelecer a cultura monoxênica de *Meloidogyne incognita* em raízes de cenoura transformadas, bem como, o estudo da interação de *Glomus clarum* e *M. incognita* em sistema dixênico, em raízes de cenoura transformadas, e a avaliação da atividade peroxidase e fenilalanina amônia liase em raízes de cenoura transformadas colonizadas por *G. clarum* após a inoculação com *M. incognita*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Raízes de cenoura transformadas

Raízes de cenoura (*Daucus carota* L. cultivar Nantes) foram transformadas segundo Bécard & Fortin (1988) utilizando-se a linhagem de *Agrobacterium rhizogenes* R1601 cedida pelo Prof. Wagner Campos Otoni do Laboratório de Cultura de Tecidos – BIOAGRO - UFV. Essas raízes fazem parte da coleção de raízes de cenoura transformadas do laboratório de Associações Micorrízicas– BIOAGRO - UFV. A manutenção dessa coleção é feita mensalmente, por sucessivos subcultivos em placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo meio mínimo (MM), pH 5,5, com 0,4 % de Phytigel® (Sigma Chemical Company EUA) armazenadas a 28 °C no escuro (Costa, 2003).

2.2. Cultura monoxênica de *Glomus clarum*

O inóculo *in vitro* de *Glomus clarum* foi estabelecido a partir da inoculação de esporos do fungo, desinfestado superficialmente, em raízes de cenoura transformadas (Bécard & Fortin, 1988; Costa, 2003). Esses fungos são mantidos *in vitro* por subcultivos trimestrais em placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo raízes de cenoura transformadas em MM, pH 5,5, com 0,4 % de Phytigel® e, constituem, o estoque *in vitro* dos FMAs, da coleção do laboratório de Associações Micorrízicas do Departamento de Microbiologia da UFV, mantidos à 27 °C, no escuro (Costa, 2003). Periodicamente, com o auxílio de microscópio estereoscópico foram observadas as estruturas típicas dos FMAs como, hifas extraradiculares e esporos.

2.3. Cultura monoxênica de *Meloidogyne incognita*

Ovos de *Meloidogyne incognita* utilizados para obtenção de cultura monoxênica foram multiplicados e mantidos em raízes de tomateiro cv Santa Clara, em solo e areia na proporção de 1:1 (v:v), em casa de vegetação e cedidos pelo prof. Leandro Grassi de Freitas do Laboratório de Controle Biológico de Fitonematóides - BIOAGRO - UFV. Foi utilizada a metodologia de Boneti & Ferraz (1981) para extração dos ovos.

Para esterilização superficial dos ovos de *M. incognita* filtros com membrana milipore de 0,45 µm, previamente esterilizados em autoclave por 20 minutos, receberam os ovos do nematóide e foram imersos, seqüencialmente, em soluções esterilizadas de penicilina 0,1 % por 45 minutos, em sulfato de estreptomicina 0,1 % por 45 minutos e Cloramina T[®] (Sigma Chemical Company EUA) 0,5 % por 10 minutos. Posteriormente, foram lavados quatro vezes em água destilada esterilizada (metodologia adaptada de Sawhney & Webster, 1975 e de Costa, 2003).

Os ovos foram retirados da membrana e homogeneizados em água destilada esterilizada e, com auxílio de pipeta de Paster, 100 ovos foram transferidos, assepticamente, para placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo raízes transformadas de cenoura em MM pH 5,5, com 0,4 % de Phytigel[®] (3 meses de cultivo) e incubadas horizontalmente invertida, no escuro a 27 °C.

Diariamente, com o auxílio de microscópio estereoscópico, foi observada a eclosão de juvenis de secundo estágio (J₂), a penetração de J₂, o número de galhas formadas, a produção de massas de ovos e uma nova eclosão de J₂,

seguido de uma nova penetração, completando um ciclo de vida. Foi determinado também, o período de formação do ciclo de vida do *M. incognita* no ambiente *in vitro*. Foram realizadas 12 repetições, considerando uma placa como uma repetição.

2.4. Cultura dixênica de *Glomus clarum* e *Meloidogyne incognita*

A cultura dixênica foi estabelecida em raízes de cenoura transformadas em placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo MM pH 5,5 com 0,4 % de Phytigel® (Bécard & Fortin 1988).

Uma galha típica contendo postura de massas de ovos formadas pelo *M. incognita in vitro* foi transferida para o centro da placa de Petri contendo raízes de cenoura transformadas colonizadas ou não por *G. clarum* com 3 meses de cultivo, com associação estabelecida. O controle foi constituído da inoculação de uma galha com massas de ovos em raízes de cenoura transformadas não colonizadas por FMA. O sistema dixênico foi incubado horizontalmente, invertido, por 80 dias, no escuro a 27 °C. Foram realizadas 4 repetições, sendo considerado cada placa de Petri (um sistema dixênico) uma repetição.

Em cada repetição, o número de esporos foi contado individualmente com auxílio de microscópio binocular aos 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 dias após a inoculação da galha e o comprimento da hifa extraradicular foi mensurado em 0 e 80 dias após a inoculação da galha. Foram retiradas fotografias das hifas extraradiculares com máquina digital Q color 3 Olympus acoplada ao microscópio invertido binocular Olympus IX 70. Com auxílio do programa Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Springs, MD, 20910) foram realizadas medições, em mm, de todas as hifas presentes nas

fotografias. No final do experimento, foi obtida a percentagem de colonização micorrízica das raízes de cenoura transformadas (Brundrett et al., 1996; Phillips & Hayman 1970) e a contagem das galhas.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ao nível de 5 % de probabilidade.

2.5. Atividade enzimática de raízes de cenoura transformadas em cultura monoxênica de *G. clarum* após inoculação de *M. incognita*

Culturas monoxênicas de *G. clarum* em raízes de cenoura transformadas de 4 meses de cultivo foram utilizadas para analisar a atividade de peroxidase (PO, EC 1.11.1.7) e fenilalanina amônia liase (PAL, EC 4.3.1.5.). Ovos de *M. incognita* foram esterilizados superficialmente conforme descrito anteriormente e homogeneizados em água destilada esterilizada. Com auxílio de pipeta de Pasteur, 100 ovos foram transferidos, assepticamente, para placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo culturas monoxênicas de *G. clarum* em raízes transformadas de cenoura (tratamento 1) e para placas somente de raízes transformadas de cenoura na ausência de *G. clarum* (controle) em MM pH 5,5, com 0,4 % de Phytigel® e incubadas horizontalmente, mas invertida, no escuro a 27 °C. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições. Amostras das raízes em 0, 1, 4 e 7 dias após a inoculação com os ovos foram retiradas para análise enzimática. Os dados foram submetidos à análise de variância a 5 % de probabilidade.

A determinação da atividade enzimática de fenilalanina amônia liase (PAL) foi obtida pela homogeneização de 0,5 g de raízes (congelados em

nitrogênio líquido e armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) com igual volume de PVPP e suspensa em 5 mL de tampão borato 25 mM, pH 8,8, em almofariz de porcelana resfriado a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os fragmentos de células foram removidos por centrifugação a 24.000 g por 30 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o sobrenadante armazenado. Para o ensaio, 200 μL do extrato enzimático obtido foram adicionados a 800 μL de solução de L-fenilalanina 15 mmol L^{-1} em tampão borato, 25 mmol L^{-1} , pH 8,8 e incubados por 1 hora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. A reação foi interrompida com adição de 50 μL de HCl 5 mol. Após o período de incubação, as amostras foram lidas a 290 nm. A atividade de PAL foi expressa em quantidade (nmol) de ácido cinâmico formado na reação por 1 hora e por conteúdo de proteína da amostra (nmol ácido cinâmico. h^{-1} . mg^{-1} de proteína). A curva padrão de ácido cinâmico foi utilizada (Wuyts et al., 2006).

A atividade da peroxidase (PO) foi determinada em amostras de 50 mg de raízes homogeneizadas com igual volume de PVPP e suspensas em 1 mL de tampão fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} , pH 6,0 em almofariz de porcelana resfriado a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. As amostras foram centrifugadas a 16.000 g por 20 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o sobrenadante utilizado no ensaio. O volume de 200 μL do extrato enzimático foi adicionado a 250 μL de água, 500 μL de H_2O_2 30 mmol L^{-1} , 500 μL de guaiacol 30 mmol L^{-1} e 1500 μL de tampão fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} , pH 6,0 a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. A mudança na densidade ótica da mistura de reação foi imediatamente registrada a 470 nm por 2,5 minutos com intervalo de 15 segundos. O branco constitui a mistura de reação sem o extrato enzimático. A atividade de PO foi expressa em unidades de absorvância (UA) por minuto por conteúdo de proteína da amostra ($\text{UA min}^{-1}\text{ mg}^{-1}$ de proteína) (Menolli et al., 2008).

A determinação de proteínas solúveis das amostras foi realizada segundo o método colorimétrico de Bradford (1976), baseado em equação de curva padrão de albumina bovina a 0,5 % (BSA) e leitura da absorbância a 595 nm.

Para a condução do experimento foram obedecidas as normas de biossegurança estabelecidas pela CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança), com autoclavagem de todo o material transgênico envolvido.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Cultura monoxênica de *Meloidogyne incognita*

A cultura monoxênica de *M. incognita* foi obtida com sucesso, sendo o nematóide capaz de reproduzir-se em condições *in vitro* em raízes de cenoura transformadas, em MM (Figura 1). *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* também já haviam sido cultivadas em raízes de cenoura transformadas (Sawhney & Webster, 1975; Verdejo et al., 1988) e de *Radopholus similis* em calos de alfafa, no qual foi observado a reprodução e todos os estádios de juvenis (Elsen et al., 2001).

A metodologia utilizada para a desinfestação superficial dos ovos não foi prejudicial para o desenvolvimento embrionário, eclosão, migração e infectividade do J₂ no hospedeiro. Dessa forma, esta metodologia pode ser adotada, uma vez que as metodologias estabelecidas para esta finalidade têm usado cloreto de mercúrio (HgCl₂), um metal tóxico para o homem (Elsen et al., 2001, 2003).

Após a inoculação verificou-se que os ovos foram distribuídos aleatoriamente sobre a superfície do meio e, também, em contato direto com as raízes de cenoura transformadas (Figura 1A e 1B). Um dia após a inoculação dos ovos, os J₂ iniciaram a eclosão (Figura 1C e 1D), que durou por 3 dias. Ao eclodir, se movimentaram aleatoriamente de forma sinuosa característica sobre a superfície do meio de cultura (Figura 1E e 1F) até a localização da raiz hospedeira (Freire et al., 2007).

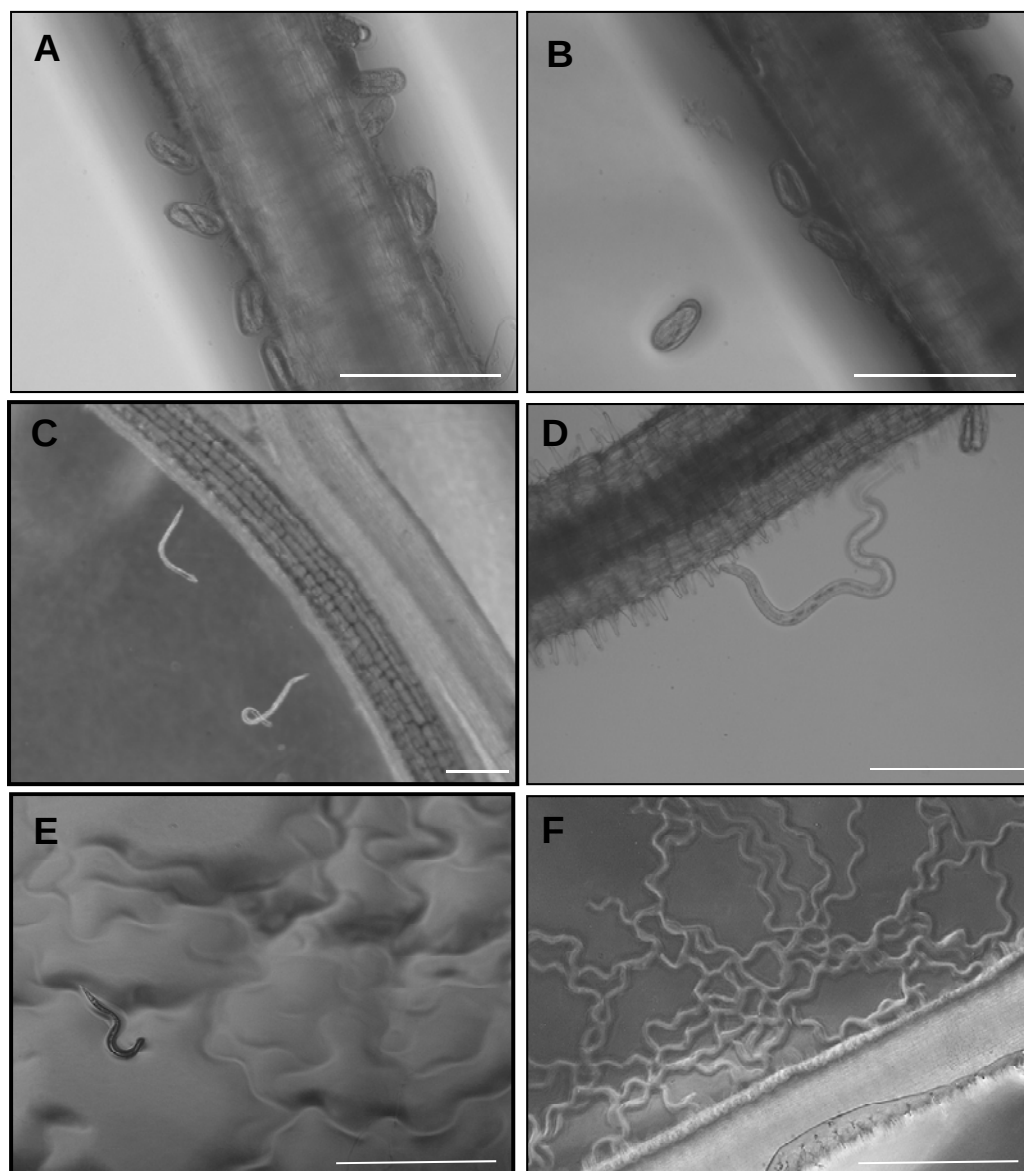


Figura 1. Cultura monoxênica de *Meloidogyne incognita* em raízes de cenoura transformadas (RT), em meio mínimo. Ovos de *M. incognita* em contato direto (A) e próximos (B) da RT. Juvenis de segundo estágio (J_2) próximos da RT (C) e detalhe do J_2 , na superfície da RT. Movimento sinuoso do J_2 na superfície do meio de cultura (E e F). Barra=0,5 mm.

No décimo quarto dia, foi observada a formação de galhas características, principalmente nas extremidades apicais das raízes (Figura 2A), mas também foram observadas na região mediana das raízes (Figura 2B). Os nematóides podem perfurar a parede celular com seu estilete, penetrar no hospedeiro e movimentar-se nos tecidos migrando em direção ao cilindro central, para o estabelecimento das células gigantes (Freire et al., 2007).

Essas galhas foram formadas, com maior frequência, nas raízes presentes na superfície do meio de cultura, diferindo do resultado de Verdejo et al. (1988) que verificaram a formação de galhas de *M. javanica* em raízes no interior do meio de cultura. Considerando que a reprodução dos nematóides não depende somente do hospedeiro, mas também, da sua movimentação (Freire et al., 2007), a superfície do meio de cultura não interferiu no seu movimento, resultando assim na sua reprodução. Ao trigésimo dia após a inoculação dos ovos, foi observada a postura de ovos em massa gelatinosa (Figura 2C).

Dessa forma, a movimentação do J₂ infectivo, aliado à temperatura adequada do ambiente *in vitro* e a compatibilidade com o hospedeiro pôde proporcionar maior rapidez de penetração e, conseqüentemente, de estabelecimento do sítio de alimentação, resultando na formação de galhas e produção de ovos.

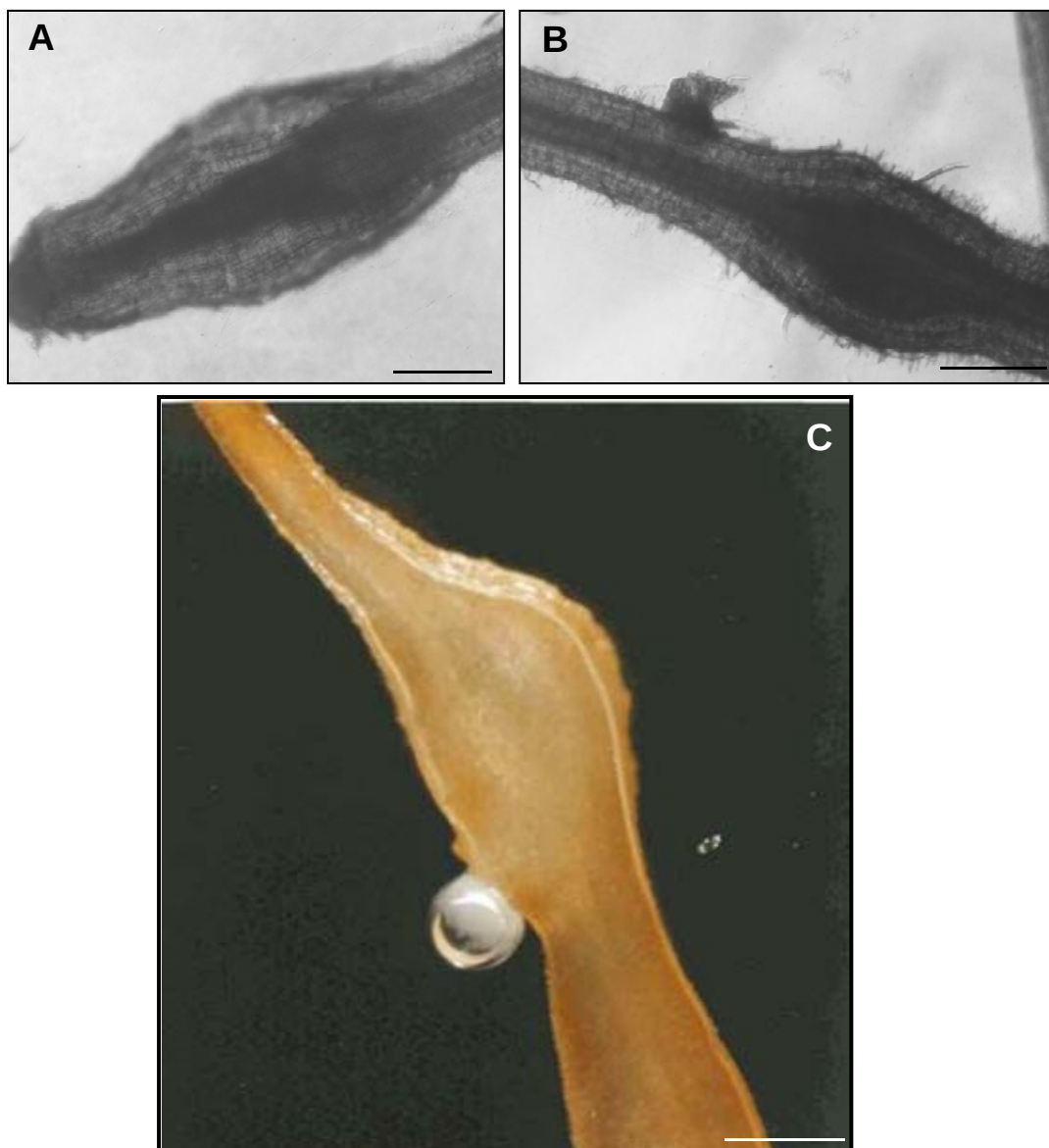


Figura 2. Cultura monoxênica de *Meloidogyne incognita* em raízes de cenoura transformadas (RT), em meio mínimo. Galha formada na extremidade das RT (A) e também em regiões medianas das RT. Postura de ovos em massa gelatinosa na superfície da galha. Barra=0,5 mm.

O ciclo de *Meloidogyne* spp. é em torno de 30 dias variando com a temperatura. No período de verão, completa seu ciclo em 30 dias e no inverno pode completar-se em até 70 dias (Rocha, 2007). O sistema monoxênico obtido em nosso trabalho permite a manutenção de temperatura constante durante todo o cultivo, dessa forma, favorece e mantém constante o ciclo de vida dos nematóides.

A cultura monoxênica de *M. incógnita* pôde ser mantida como cultura contínua através da transferência de fragmentos de raízes contendo galhas com massas de ovos ou somente dos ovos para novos fragmentos de raiz crescendo ativamente. Assim, esta técnica mostrou-se bastante útil na manutenção de culturas axênicas de nematóides *in vitro*.

3.2. Cultura dixênica de *Glomus clarum* e *Meloidogyne incognita*

A cultura dixênica de *G. clarum* e *M. incognita* foi estabelecida em raízes de cenoura transformadas (Figura 3). *M. incognita* foi capaz de completar o ciclo de vida na presença do fungo micorrízico. Elsen et al. (2001, 2003) também estabeleceram culturas dixênicas de *G. intraradices* – *Radopholus similis* e *G. intraradices* – *Pratylenchus coffeae*, ambos em raízes de cenoura transformadas.

Nove dias após a inoculação da galha contendo massas de ovos, foi observada a eclosão de J₂, que movimentou sobre a superfície do meio de cultura e, 48 horas após a eclosão, pode-se observar que todos os J₂ penetraram nas raízes, uma vez que não foram encontrados no meio de cultura.

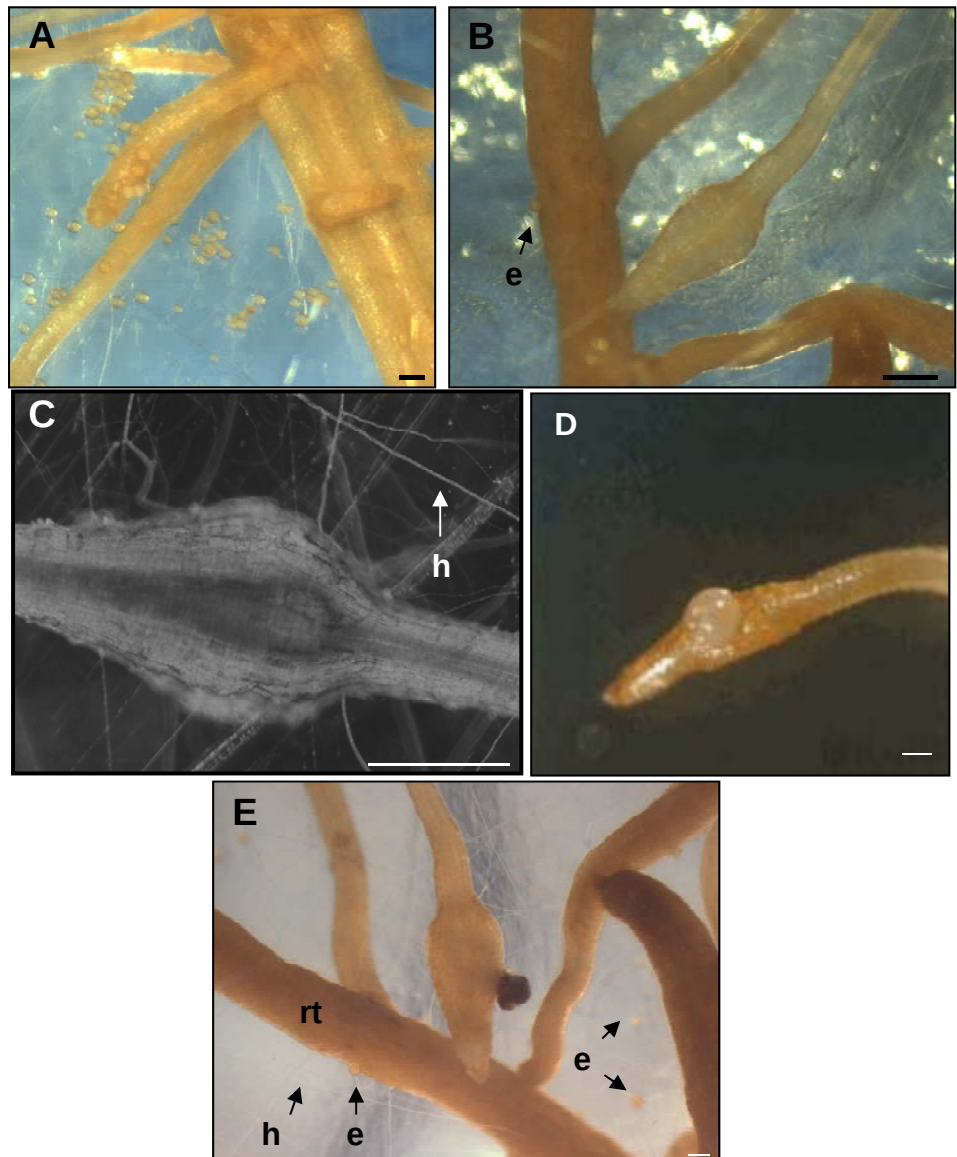


Figura 3. Cultura dixênica de *Glomus clarum* e *Meloidogyne incognita* em raízes de cenoura transformadas (RT), em meio mínimo. Esporos produzidos na superfície do meio mínimo e na RT (A). Galha formada na extremidade da RT e presença de esporos (e) de *G. clarum* (B). Detalhe da galha formada em meio de hifas (h) (C). Detalhe da postura de ovos em massa gelatinosa na superfície da RT (D). Postura de ovos em massa gelatinosa na superfície RT (rt) e presença de hifas (h) e esporos (e) de *G. clarum*. Barra em linha branca=0,5 mm, barra em linha preta= 1 mm.

A massa de ovos de *M. incognita* utilizada como inóculo mostrou-se eficiente para obtenção da cultura. Este tipo de inóculo é transferido em condições assépticas e várias centenas de ovos podem ser transferidas em única vez. Entretanto, a padronização do inóculo não é possível, uma vez que, o número de ovos por massa de ovo é altamente variável. Verdejo et al. (1998) quantificou o número de ovos de *M. javanica* produzidos em raízes de batata transformadas e observou variação entre 245 e 356 ovos por massa de ovos.

As placas contendo a cultura dixênica continham muitos esporos na superfície do meio de cultura e também na superfície das raízes de cenoura (Figura 3A). A formação de galhas características se deu aos 15 dias após a inoculação da massa de ovos (Figura 3B e 3C) em meio às hifas e esporos de *G. clarum* e a postura dos ovos em uma massa gelatinosa, 15 dias após a formação das galhas (Figura 3D e 3E).

A produção de esporos formados durante os 80 dias em cultura dixênica não foi afetada pela inoculação dos ovos e pela movimentação de J₂. Raízes inoculadas ou não com o nematóide não alteraram significativamente o número de esporos durante os 80 dias de incubação (Figura 4). Nossos resultados corroboram com os de Costa (2003) que observou que em culturas monoxênicas de *G. clarum*, o número de esporos à 28 °C após 3 meses de cultivo, estabiliza a produção de esporos.

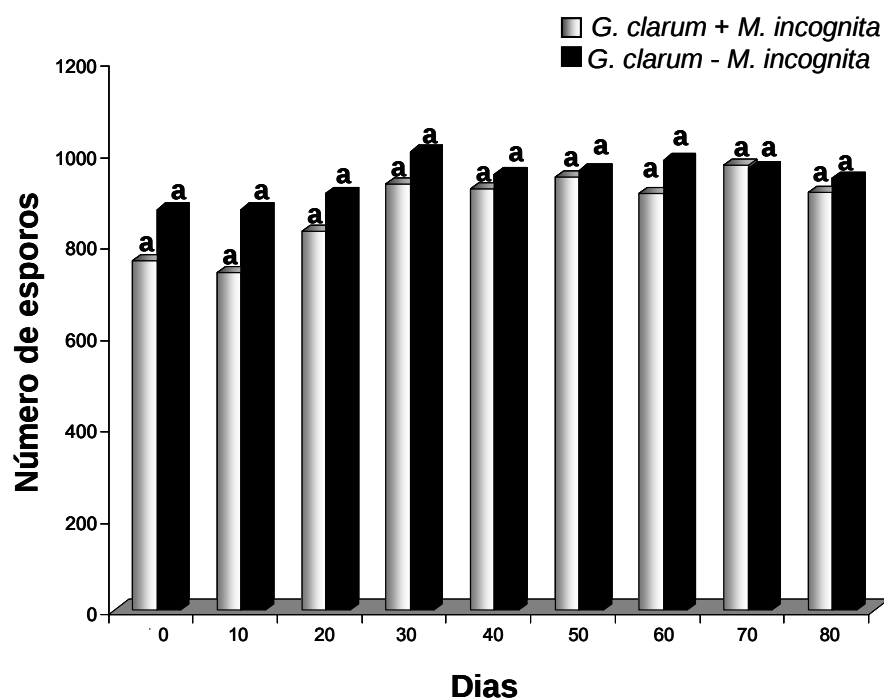


Figura 4. Número de esporos de *Glomus clarum* produzidos em cultura dioxênica em raízes de cenoura transformadas em 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 dias após inoculação de ovos de *Meloidogyne incognita* ou não. Médias nas colunas seguidas pela mesma letra, dentro do mesmo dia, não diferem significativamente a 5 % pelo teste F.

A densidade de hifas no meio de cultura foi de 145 cm² cm⁻² e 141 cm² cm⁻² em raízes inoculadas e não inoculadas com nematóide, respectivamente, não diferindo estatisticamente entre estes tratamentos inoculados ou não em 0 e 80 dias após a inoculação (Tabela 1). Oitenta dias após a inoculação, a densidade da hifa foi estatisticamente igual, tanto no tratamento com ou sem os nematóides (Tabela 1).

Tabela 1. Densidade de hifa (DH) (cm. cm⁻²) de *Glomus clarum* (Gc) em raízes de cenoura transformadas (RT), em meio mínimo, em 0 e 80 dias após a inoculação de *Meloidogyne incognita* (Mi) e percentagem de colonização (Col) (%) e número de galhas (G) (n) após 80 dias da inoculação de *M. incognita*.

	DH (cm. cm ⁻²)		Col (%)	G (n)
	Dias após inoculação			
	0	80		
RT + Gc + Mi	145 a	171a	67 a	17b
RT + Gc - Mi	141 a	176 a	73 a	0
RT – GC + Mi	0	0	0	23a

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste F, a 5 % de probabilidade.

Esses resultados evidenciam que os J₂ ao movimentarem na superfície do meio de cultura não interferem no crescimento e desenvolvimento das hifas e, também, na formação e produção de esporos que estão intimamente associadas.

A percentagem de colonização não diferiu entre as raízes inoculadas ou não com os nematóides (Tabela 1). A produção de esporos é relacionada com a frequência e intensidade de colonização, sugerindo assim, uma relação entre o espalhamento intraradicular e o desenvolvimento do fungo e esporulação (Declerck et al., 1996). O desenvolvimento da raiz e do micélio extraradicular é intimamente associado. Ambos crescem juntos durante o crescimento ativo da raiz seguido de um período em que só o fungo se desenvolve. A produção de esporos depende da biomassa do micélio extraradicular e da realocação de nutrientes via hifa (Declerck et al., 1996).

Em *P. coffeae* em cultura dixênica com *R. similis*, Elsen et al (2003) não observaram diferenças na dinâmica de esporulação entre os tratamentos com ou sem nematóide. Dessa forma, os nematóides não influenciaram a produção de esporos.

Foi observada ao final do experimento que o número de galhas foi reduzido em raízes de cenoura transformadas colonizadas pelo FMA quando comparado com raízes não colonizadas (Tabela 1). Esses resultados corroboram com os de Elsen et al. (2003) que observou que em cultura monoxênica na presença de *Glomus intraradices* a população de *Pratylenchus coffeae* foi reduzida em 50 % quando comparada com o controle. Entretanto este resultado não foi observado para todos os estádios de desenvolvimento do nematóide. Em cultura dixênica de *G. intraradices* e *Radopholus similis* o total da população foi suprimido em presença do fungo (Elsen et al., 2001).

3.3. Atividade de peroxidase e fenilalanina amônia-liase em raiz de cenoura transformada em cultura dixênica

As raízes de cenoura apresentaram média de colonização de 66 % e a simbiose estabelecida incrementou a atividade da peroxidase (PO) nas raízes de cenoura transformadas infestadas com *M. incognita* (Figura 5). Em 0 e 1 dia após a aplicação dos ovos, não foi detectada diferença na atividade da PO entre as raízes com ou sem o fungo *G. clarum* (Figura 5), entretanto, aos 4 e 7 dias, essa atividade foi significativamente maior, nas raízes colonizadas pelo fungo micorrízico (Figura 5).

O aumento da atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL) só foi observada nas raízes inoculadas com o fungo micorrízico aos 4 dias após a inoculação do nematóide (Figura 6). Nos outros dias não houve diferença estatística na atividade.

As raízes inoculadas tanto com o fungo e com os nematóides apresentaram maior atividade da PO e PAL. Entretanto nessas condições avaliadas fica pouco evidente se esse aumento na atividade pode ser atribuído ao fungo ou à inoculação do nematóide. Wuyts et al. (2006), verificaram que a resistência de plantas a nematóides está relacionada ao aumento na atividade das enzimas PAL, PO, polifenoloxidasas, superóxido dismutase e quitinases.

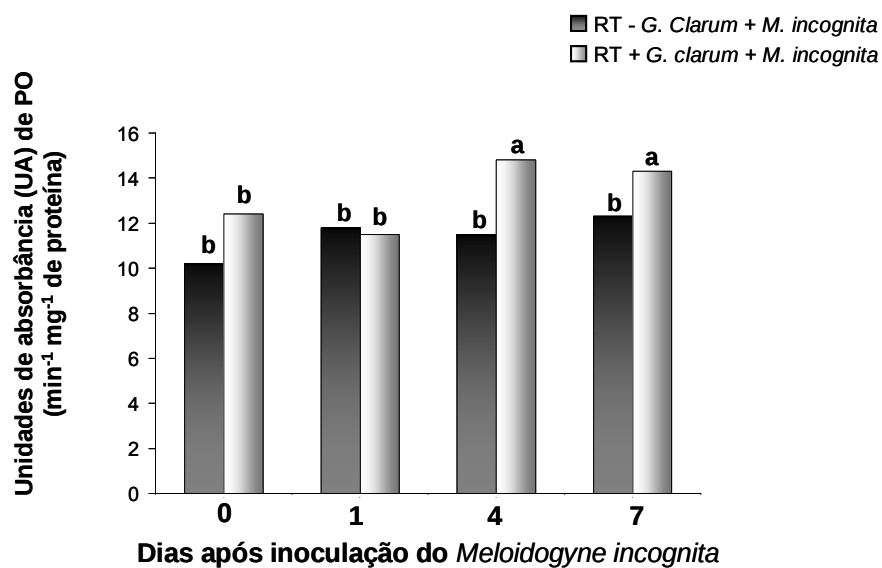


Figura 5: Unidades de absorbância (UA) de peroxidase (PO) min⁻¹ mg⁻¹ de proteína, em raízes de cenoura transformadas (RT) por *Agrobacterium rhizogenes* colonizadas por *Glomus clarum* (+) ou não (-) antes (0 dias), 1, 4 e 7 dias após a inoculação de ovos do *Meloidogyne incognita*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, entre coluna, no mesmo dia, pelo teste F a 5 % de probabilidade.

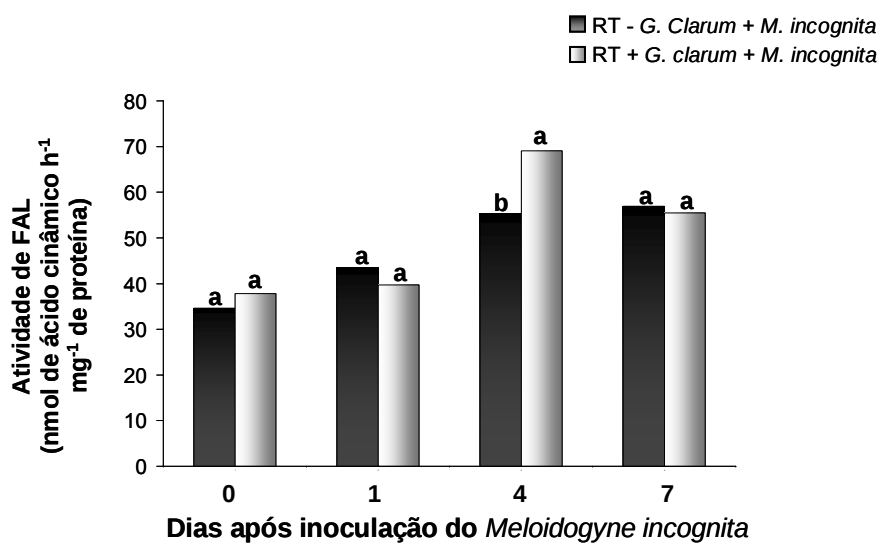


Figura 6: Atividade de fenilalanina amônia liase (FAL) em nmol de ácido cinâmico h⁻¹ mg⁻¹ de proteína em raízes de cenoura transformadas por *Agrobacterium rhizogenes* colonizadas por *Glomus clarum* (+) ou não (-) antes (0 dias), 1, 4 e 7 dias após a inoculação de ovos de *Meloidogyne incognita*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, entre colunas, no mesmo dia, pelo teste F a 5 % de probabilidade.

A alta atividade de PO é detectada no início do estabelecimento da associação micorrízica e, posteriormente, é reduzida (García-Garrido & Ocampo, 2002). Este padrão de resposta se dá devido ao acúmulo de EORs como H_2O_2 e O_2^- no sítio de infecção. Entretanto, durante o desenvolvimento intracelular do FMA ocorre explosão oxidativa localizada, acarretando em acúmulo de EORs e, conseqüentemente, ativação de enzimas antioxidantes (García-Garrido & Ocampo, 2002; Costa, 2003; Lambais et al., 2003). Essa enzima, em associação micorrízica, tem merecido atenção especial, por estar relacionada em vários mecanismos de defesa, tais como a síntese de lignina, a geração de EORs e, também, na indução de resistência atuando como barreira para a invasão de patógenos em tecidos de plantas (Arfaoui et al., 2006, De Gara et al., 2003).

Por ser expressa em associações micorrízicas, a PO, pode contribuir no aumento de resistência de certos patógenos de solo, como os nematóides. O aumento da PO e da catalase em raízes micorrizadas, também coincide com acúmulo de ácido salicílico (AS). O AS é um sinalizador molecular envolvido na ativação de reação de defesa planta-patógeno e, ao acumular, aumenta a expressão de PAL (Blilou et al., 2000).

Esse aumento da expressão de PAL leva a um acelerado acúmulo de fitoalexinas, metabólitos secundários que são capazes de impedir ou reduzir a atividade do nematóide. Resposta ao ataque de patógenos, expressando aumento da PAL, tem sido detectada horas após inoculação de patógeno e enzima peroxidase, tem-se observado que sua atividade aumenta gradualmente, após inoculação do patógeno (del Río et al., 2006).

As respostas de defesa são geralmente, relacionados às raízes *in vivo*, entretanto, poucos relatos mostram estes mecanismos de defesa em ambiente *in vitro* em raízes transformadas. Os trabalhos envolvendo cultura axênica de Elsen et al. (2001, 2003) não avaliaram mecanismos de defesa das raízes, e, sim, a reprodução dos FMAs e nematóides. Costa (2003) demonstrou que essas raízes associadas ao FMA, induzem mecanismos de defesa em condições de exposição a altas temperaturas, através do aumento de atividade de enzimas antioxidantes.

Raízes de cenoura transformadas associadas aos fungos micorrízicos permitiram aumento da proteção contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* pelo acúmulo de quitinases no sítio de penetração do patógeno, em ambiente *in vitro* (Benhamou et al., 1994).

Embora estudos em campo e em casa de vegetação serem necessários para dar veracidade à complexa interação que ocorre *in vivo*, o uso de culturas axênicas permite isolar o microrganismo em estudo de efeitos bióticos e abióticos presentes e, também, observações não destrutivas das interações e constatar que neste ambiente *in vitro*, é possível determinar atividades enzimáticas.

4. CONCLUSÕES

- Raízes de cenoura transformadas podem ser consideradas como boas culturas para reprodução e manutenção de culturas axênicas de *M. incognita* livre de contaminantes.
- *M. incognita* é capaz de infectar e reproduzir em raízes de cenoura transformadas, formando galhas.
- *G. clarum* e *M. incognita* são capazes de completar seus ciclos de vida, em presença de ambos, em raízes de cenoura transformadas.
- *M. incognita* não afeta a reprodução de *G. clarum* em cultura dixênica.
- *G. clarum* reduziu o número de galhas de *M. incognita* em cultura dixênica.
- Raízes de cenoura transformadas apresentaram maiores atividades de peroxidase e fenilalanina amônia liase, quando associadas aos FMAs e aos nematóide, entretanto, esse aumento não pode ser atribuído ao fungo ou ao nematóide, nas condições estudadas .

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arfaoui, A.; El Hadrami, A.; Mabrouk, Y.; Sifi, B.; Boudabous, A.; El Hadrami, I.; Daayf, F.; Chérif, M. Treatment of chickpea with *Rhizobium* isolates enhances the expression of phenylpropanoid defense-related genes in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. **Plant Physiology and Biochemistry**, 45: 470-479, 2007.
- Arfaoui, A.; Sifi, B.; Boudabous, A. Hadrami, I.; Chérif, M. Effect of *Rhizobium* isolates on isoflavonoid levels in chickpea plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. **Phytopathologia Mediterrânea**, 45(1):24-34, 2006.
- Azcón-Aguilar, C. & Barea, J. M. Arbuscular micorrizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved. **Mycorrhiza**. 6: 457-464, 1996.
- Bécard, G. & Fortin, A. Early events of vesicular arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. **New Phytologist**, 108:211-218, 1988.
- Benhamou, N.; Fortin, J. A.; Hamel, C.; St. Arnaud, M.; Shatila A. Resistance response of mycorrhizal Ri T-DNA transformed carrot roots to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*. **Phytopathology**, 84:958-968, 1994.
- Berbara, R. L. L.; Souza, F. A.; Fonseca, H. M. A. C. **Fungos micorrízicos arbusculares: muito além da nutrição**. In: Nutrição Mineral de Plantas, 54-79, 2006.
- Bilou, I.; Ocampo, J. A.; Garcia-Garrido, J. M.; Induction of *Ltp* (lipid transfer protein) and *Pal* (phenylalanine ammonia lyase) gene expression in rice roots colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Journal of Experimental Botany**, 51:1969–1977, 2000.
- Bonetil, J. I. S & Ferraz, S. Modificação do método de Hussey & Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, 6:533, 1981.

- Borges, A. J. S.; Trindade, A. V.; Matos, A. P.; Peixoto, M. F. S. Redução do mal-do-panamá em bananeira-maçã por inoculação de fungo micorrízico arbuscular. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 42:35-41, 2007.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72:248-254, 1976.
- Brundrett, M. C. Coevolution of roots and mycorrhizal of land plants. **New Phytologist**, 154:275-304, 2002.
- Brundrett, M.; Bougher, N.; Dell, B.; Grove, T.; Malajczuk, N. **Working with Mycorrhizas in Florestry and Agriculture**. ACIAR Monograph, 374p. 1996.
- Cordier, C.; Pozo, M. J.; Barea, J. M.; Gianinazzi, S.; Gianinazzi-Pearson V.; Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 11:1017-1028, 1998.
- Costa, F. A. **Micorrizas arbusculares e enzimas do estresse oxidativo em raízes de cenoura transformada e em morangueiro**. Viçosa: UFV, 2003. 92 p. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal d Viçosa, 2003.
- De Gara, L.; Pinto, M. C.; Tommasi, F. The antioxidant systems vis-a-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. **Plant Physiology and Biochemistry**, 41:863–870, 2003.
- Declerck, S.; Risede, J. M.; Delvaux, B. Greenhouse response of micropropagated bananas inoculated with *in vitro* monoxenically produced arbuscular mycorrhizal fungi. **Scientia Horticulturae**, 93:301-309, 2002.
- Declerck, S.; Strullu, D. G.; Plenchette, C. *In vitro* mass-production of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus versiforme*, associated with Ri T-DNA transformed carrot roots. **Mycological Research**, 100:1237-1242, 1996.
- del Río, L. A.; Sandalio, L. M.; Corpas, F. J.; Palma, J. M.; Barroso, J. B. Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in Peroxisomes. Production, Scavenging, and Role in Cell Signaling. **Plant Physiology**, 141:330-335, 2006.

- Elsen, A.; Declerck, S.; De Waele, D. Effects of *Glomus intraradices* on the reproduction of the burrowing nematode (*Radopholus similis*) in dioxenic culture. **Mycorrhiza**, 11:49-51, 2001.
- Elsen, A.; Declerck, S.; De Waele, D. Use of Root Organ Cultures To Investigate the Interaction between *Glomus intraradices* and *Pratylenchus coffeae*. **Applied and Environmental Microbiology**, 69: 4308–4311., 2003.
- Elsen, A.; Gervasio, D.; Swennen, R.; De Waele, D. AMF-induced biocontrol against plant parasitic nematodes in *Musa* sp.: a systemic effect. **Mycorrhiza**, 18:251-256, 2008.
- Fortin, J. A.; Bécard, G.; Declerck, S.; Dalpé, Y.; St. Arnaud, M.; Coughlan, A. P.; Piché, Y. Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. **Canadian Journal of Botany**, 80:1-20, 2002.
- Freire, E. S.; Campos, V. P.; Dutra, M. R.; Rocha, F. S.; Silva, J. R. C.; Pozza, E. A. Infectividade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita* em tomateiro após privação alimentar em solo e água em diferentes condições. **Summa phytopathologica**, 33:270-274, 2007.
- Garcia-Garrido, J. M. & Ocampo, J. A. Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Journal of Experimental Botany**, 53: 1377–1386, 2002.
- Gianinnazzi-Pearson, V. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting the roots of symbiosis. **The Plant Cell**, 8:1871-1883, 1996.
- Hol, W. H. G. & Cook, R. An overview of arbuscular mycorrhizal fungi–nematode interactions. **Basic and Applied Ecology**, 6:489-503, 2005.
- Jaiti, F. Meddich, A.; El Hadrami, I. Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi in the protection of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) against bayoud disease. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 71:166–173, 2008.
- Lambais, M. R.; Ríos-Ruiz, W. F.; Andrade, R. M. Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, 160:421-428, 2003.
- Meira, L. S. **Atividade de enzimas do estresse oxidativo em morangueiro micropropagado e inoculado com fungos micorrízicos arbusculares durante a aclimatização**. Viçosa: UFV, 2004. 64 p. Dissertação

- (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2004.
- Menolli, L. N.; Finger, F. L.; Puiatti, M.; Barbosa, J. M.; Barros, R. S. Atuação das enzimas oxidativas no escurecimento causado pela injúria por frio em raízes de batata batata-baroa. **Acta Science Agronomie**, 30:57-63, 2008.
- Phillipis, J. M. & Hayman, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transaction of the British Mycological Societe**, 55:158-161, 1970.
- Pinochet, J. C.; Calvet, A.; Camprubi, C.; Fernandez. Interactions between migratory endoparasitic nematodes and arbuscular mycorrhizal fungi in perennial crops: a review. **Plant and Soil**, 185:183-190, 1996.
- Pozo, M. J.; Cordier, C.; Dumas-Gaudot, E.; Gianinazzi, S.; Barea, J., M.; Azcón-Aguilar, C. Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defense responses *Phytophthora* infection in tomato plants. **Journal of Experimental Botany**, 53:525-534, 2002.
- Ritzinger, C. H. S. P.; Borges, A. L.; Ledo, C. A. S.; Caldas, R. C. Fitonematóides associados a bananais ‘pacovan’ sob condição de cultivo irrigado: relação com a produção. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 29:677-680, 2007.
- Rocha, F. C. **Aspectos da coloração, ciclo de vida, parasitismo por *Pasteuria penetrans* e suas relações com as reserva energética de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne* spp.** Lavras: UFLA, 2007. 148p. Dissertação (Doutorado em Agronomia) – UFLA. 2007.
- Sawhney, R. & Webster J. M. The role of plant growth hormones in detemining the resistance of tomato plants to the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Nematologica**, 21:95-103, 1975.
- Selosse, M. A.; Baudoin, E.; Vandenkoornhuyse, P. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. **Compts Rendus Biologies**, 327: 639–648, 2004.
- Siddiqui, Z. A. & Mahmood, I. Role of plant symbionts in nematode management: A review. **Bioresource Technology**, 54: 217-226, 1995.

- Verdejo, S.; Jaffee, B. A.; Mankau, R. Reproduction of *Meloidogyne javanica* on plant roots genetically transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. **Journal of Nematology**, 20:599-604, 1988.
- Wuyts, N.; Waele, D.; Swennen, R. Activity of phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenol oxidase in roots of banana (*Musa acuminata* AAA, cvs Grande Naine and Yangambi Km5) before and after infection with *Radopholus similis*. **Nematology**, 8:201-209, 2006.

CAPÍTULO II

Aclimatização de plantas de bananeira micropropagada micorrizadas *in vitro*

CAPÍTULO II

Aclimatização de plantas de bananeira micropropagada micorrizadas *in vitro*

RESUMO

Mudas de bananeiras só podem ser comercializadas se estas forem micropropagadas e livres de pragas e doenças. O sucesso da micropropagação depende da aclimatização, uma fase delicada para plantas. Nessa etapa, a inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) é uma medida importante, visto que esses fungos proporcionam efeitos benéficos ao crescimento das plantas e podem garantir a sobrevivência. A inoculação dos FMA ainda no ambiente *in vitro* é possível através do sistema de cultivo tripartite. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da inoculação de *Glomus clarum in vitro* sobre o desenvolvimento e sobrevivência de mudas micropropagadas de bananeira, cultivares Prata-Anã e FHIA 01. Os cv. Prata-Anã e FHIA 01 foram enraizadas em meio de cultura e, após 30 dias, foram transferidos para recipiente do tipo magenta contendo substrato e inoculados com *G. clarum*, produzidos em raízes de cenoura transformada, e acondicionados em embalagem de polipropileno, em ambiente umidificado e vedado. Após 50 dias em sala de crescimento, os cv. Prata-Anã e FHIA 01 apresentaram 30 % e 34 % de colonização micorrízica, respectivamente. Entretanto, não houve diferença no crescimento no ambiente *in vitro* das plantas inoculadas ou não com o FMA. Após a micorrização *in vitro*, as plantas dos dois cultivares foram aclimatizadas em casa de vegetação, onde obteve-se 100 % de sobrevivência. Após 60 dias em casa de vegetação, o FMA proporcionou um melhor desenvolvimento tanto do sistema radicular e da parte aérea e, também, maior conteúdo de nutrientes da parte aérea da Prata-Anã e FHIA 01. Esses resultados mostram que o sistema tripartite proporcionou o estabelecimento da associação micorrízica, que promoveu o crescimento e o desenvolvimento da Prata-Anã e FHIA 01.

Palavras-chave: micorrização *in vitro*, micropropagação, aclimatização, *Musa* sp, fungos micorrízicos arbusculares.

1. INTRODUÇÃO

A bananicultura é atividade de importância econômica no Brasil e no mundo. O Brasil destaca-se como segundo maior produtor mundial com produção, em 2005 de 6,99 milhões de toneladas, sendo também o segundo maior consumidor (FAO, 2005). Essa cultura é frequentemente afetada por problemas fitossanitários e a Sigatoka-Negra, causada por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, é considerada a principal doença, com perdas de 100 % dos bananais (Ritzinger et al., 2007).

Como consequência, foi aprovada a Instrução Normativa Nº 17 de 31 de maio de 2005 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento que determina que o trânsito de mudas de bananeira atualmente só é permitido se estas forem provenientes de áreas livres da Sigatoka Negra e que as mudas sejam micropropagadas e provenientes de matrizes livres de pragas e doenças (Brasil, 2005).

Neste contexto, a micropropagação constitui importante ferramenta tecnológica para propagação clonal massal de plantas matrizes de alta qualidade. A produção comercial de bananeira por meio da cultura *in vitro* tem sido empregada com sucesso, possibilitando a produção de mudas superiores e praticamente livres de pragas e doenças (Sanada, 1993). Mudas micropropagadas produzem 30 % a mais do que as convencionais, permitem colheita sincronizada nos primeiros ciclos da cultura, possibilitam maior vigor das plantas (Borges et al., 1997; Lemos et al., 2001; Jaizme-Vega et al., 2003).

Na micropropagação tenta-se eliminar os organismos associados ao tecido vegetal, prezando-se condições assépticas, que geralmente são

estendidas para os estádios iniciais da aclimatização (Lins et al., 2003). Entre esses microrganismos excluídos, encontram-se os benéficos como os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), que são simbioses obrigatórios. Os FMA associam-se às raízes de plantas e proporcionam aumentos no vigor, na sobrevivência e na produtividade de plantas micropropagadas devido à melhoria do estado nutricional e à maior tolerância a fatores de estresse biótico e abiótico (Azcón-Aguilar et al., 1997; Yano-Melo et al., 1999; Raí, 2001; Estrada-Luna & Davies, 2003; Costa, 2003).

A inoculação de FMA, ainda no ambiente *in vitro*, é possível graças ao desenvolvimento de cultura de raiz para o estabelecimento dos fungos em condições axênicas, livre de contaminantes (Pons et al. 1983; Diop et al., 1994; Elmeskaoui et al., 1995; Declerck et al., 1996;). FMA produzidos monoxenicamente, produzem propágulos viáveis, de alta qualidade, livre de contaminantes e hábeis em colonizar novas raízes (Diop et al., 1994; Declerck et al., 1996; St Arnaud et al., 1996; Costa, 2003).

A inoculação *in vitro* de FMA em plantas micropropagadas, sob ambiente enriquecido com CO₂, resultou em raízes mais desenvolvidas, melhor crescimento da parte aérea, maior conteúdo hídrico, aumento da matéria seca tanto da parte aérea e sistema radicular e 100 % de sobrevivência na fase de aclimatização (Elmeskaoui et al., 1995; Hernández-Sebastia et al., 1999; Meira, 2004).

As plantas micropropagadas necessitam da fase de aclimatização, que é etapa final da micropropagação. As anormalidades adquiridas no ambiente *in vitro*, como o menor crescimento e o desenvolvimento da planta, aparelho fotossintético ineficiente, sistema radicular pouco desenvolvido e frágil,

precisam ser corrigidas e adaptados ao novo ambiente (Preece e Sutter, 1991; Estrada-Luna & Davies, 2003). Dessa forma, durante esta fase podem ocorrer perdas significativas das mudas (Lemos et al., 2001).

O estabelecimento da associação micorrízica tem sido decisivo na fase de aclimatização de plantas micropropagadas (Hooker et al., 1994; Declerck et al., 2002; Kapoor et al., 2008), proporcionando maior crescimento a várias espécies de plantas incluindo a bananeira (Azcón-Aguilar, 1992; Elmeskaoui et al., 1995; Yano-Melo et al., 1995; Costa, 2003, Jaizme-Vega et al., 2003). Esse crescimento está relacionado ao aumento da tolerância ao estresse, devido à maior absorção de água e nutrientes e às maiores taxas fotossintética e transpiratória (Yano-Melo et al., 1999; Costa, 2003; Estrada-Luna & Davies, 2003; Meira, 2004).

Plantas micropropagadas colonizadas por FMA apresentam um incremento de até 21 % no índice de sobrevivência na fase de aclimatização, devido ao aumento no conteúdo de nutrientes, em especial o fósforo (Azcón-Aguilar et al., 1997; Schubert & Lubraco, 2000; Costa, 2003; Moraes et al., 2004).

Os diferentes tipos de estresses ocorridos durante a aclimatização proporcionados pela transição do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*, podem ser amenizados pelos FMA (Hernandez et al., 2001). Nesta fase ocorre alteração no metabolismo e indução à mudanças no desenvolvimento das plantas, causando danos celulares pela formação de espécies de oxigênio reativas (EOR) (Hernandez et al., 2001). Esses fungos induzem atividades de enzimas antioxidantes durante o processo de colonização e estabelecimento da simbiose em resposta às EOR formadas (Hernandez et al., 2001). Plantas que

aumentam a produção dessas enzimas mostram-se mais tolerantes a diferentes estresses e as micorrizas induzem ao aumento da atividade dessas enzimas (Alguacil et al., 2003). O aumento da atividade dessas enzimas tem sido observado em raízes de plantas colonizadas por FMA, (Santos et al., 2001; Costa, 2003; Lambais et al., 2003).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da inoculação de *Glomus clarum in vitro* sobre o desenvolvimento e sobrevivência de mudas micropropagadas de bananeiras, cultivares Prata-Anã e FHIA 01.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e cultivo *in vitro*

Foram utilizadas mudas de bananeira (*Musa* sp.) cultivadas *in vitro*, cultivar Prata-Anã e FHIA 01 (Fundación Hondureña de Investigación Agrícola), cedidas pelo Professor Dalmo Lopes de Siqueira, do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG.

As mudas *in vitro* foram transferidas para meio de cultura de multiplicação - MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 8 g L⁻¹ de Ágar e 7 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) e 100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico a pH 5,5. Cinco explantes foram subcultivados em frascos de vidro de 15 x 6 cm contendo 40 mL de meio de multiplicação, vedados com tampa plástica. A fase de multiplicação foi constituída de 5 subcultivos, cada um com duração média de 30 dias, em sala de crescimento a 26 ± 2 °C e 16 horas diárias de luz, irradiância de 36 µmol m⁻² s⁻¹, fornecida por lâmpadas fluorescentes tipo branca. Ao término do 5º subcultivo, os explantes foram enraizados.

O enraizamento foi realizado em meio de cultura constituído de 50 % da concentração original de MS, 15 g L⁻¹ de sacarose e 8 g L⁻¹ de Ágar, sem reguladores de crescimento, durante 30 dias. Os explantes foram crescidos em sala de crescimento à temperatura de 26 ± 2 °C, sob 16 horas diárias de luz, irradiância de 36 µmol m⁻² s⁻¹, fornecida por lâmpadas fluorescentes tipo branca.

2.2. Cultura monoxênica de FMA

O inóculo *in vitro* de *Glomus clarum* foi produzido em raízes de cenoura transformadas (Bécard e Fortin, 1988), utilizando-se a linhagem de *Agrobacterium rhizogenes* R1601, cedida pelo Prof. Wagner Campos Otoni do Laboratório de Cultura de Tecidos/BIOAGRO/UFV. Os estoques do inóculo *in vitro* dos FMA, a partir da coleção do Laboratório de Associações Micorrízicas do Departamento de Microbiologia da UFV, foram mantidos por subcultivos em placas de Petri em meio mínimo, pH 5,5, com 0,4 % de Phytigel® (Sigma Chemical Company EUA) contendo raízes de cenoura transformadas (Bécard e Fortin, 1988), mantidas à 27 °C, no escuro (Costa, 2003).

2.3. Sistema de cultivo tripartite *in vitro*

O sistema de cultivo tripartite (raiz de cenoura transformada + *G. clarum* + raiz de bananeira) (Figura 1) *in vitro* de plantas micropropagadas de Prata-Anã e FHIA 01, inoculadas com *G. clarum*, produzidos em cultura monoxênica em raízes de cenoura transformadas foi realizado 45 dias após o enraizamento. O substrato utilizado foi constituído de mistura de solo: vermiculita (2:1 v/v) acondicionados em recipientes do tipo magenta de dimensões 8 x 8 x 8 cm. Cada recipiente recebeu 300 mL de substrato e 150 mL de solução de Clark, (Clark, 1975) ½ força, para o nutriente fósforo e, acomodada em embalagem transparente sanfonada de polipropileno (FAAL Embalagens) de dimensões 8 x 8 x 40 cm contendo filtro bacteriológico tipo S. O ambiente *in vitro* foi umidificado com adição de 50 mL de água destilada entre a embalagem e o recipiente. Esse sistema foi autoclavado por 20 minutos à 121 °C. No momento da transferência das plantas enraizadas para o substrato, sob condições

assépticas, foram inoculados próximo ao sistema radicular, cubos de gel (meio de cultura) contendo 120 esporos e, também, hifas e raízes de cenoura transformadas e colonizadas com FMA. Em cada embalagem de polipropileno foi acondicionada recipiente magenta contendo uma planta e, posteriormente, vedada. As plantas controle não receberam o fungo micorrízico, somente cubos de gel contendo raízes de cenoura transformadas. As plantas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 26 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 horas diárias de luz, irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes tipo branca durante 60 dias.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente ao acaso para os dois cultivares (Prata-Anã x FHIA 01) com presença ou a ausência do fungo micorrízico, com 10 repetições.

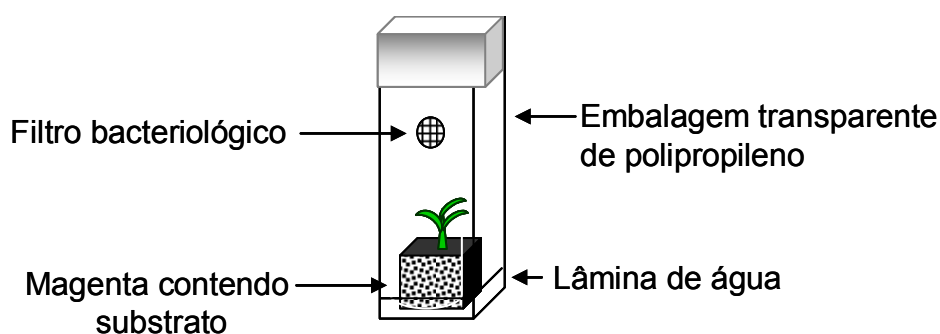


Figura 1: Sistema tripartite de bananeira micropropagada e inóculo monoxênico de *Glomus clarum* em embalagem transparente de polipropileno.

2.4. Aclimatização das plantas

A aclimatização das plantas de bananeiras micropropagadas, inoculadas ou não, com o FMA foi realizada ao final de 50 dias de cultivo no sistema tripartite. As plantas foram transplantadas para copos plásticos contendo 100 mL de substrato esterilizado, composto de solo-vermiculita (2:1) e, em seguida, mantidas em casa de vegetação sob cobertura sombrite, em bandejas plásticas contendo uma lâmina de água, de forma que o sistema radicular permanecesse sempre úmido, durante 10 dias. Após esse período, as plantas foram transferidas para vasos de 500 mL contendo o mesmo substrato e mantidas em casa de vegetação, entretanto, sem a cobertura de sombrite. Semanalmente, foi aplicado, por planta, 50 mL de solução nutritiva de Clark (Clark, 1975), com 1/2 força para o nutriente fósforo.

2.5. Avaliações

A percentagem de sobrevivência das plantas foi avaliada durante a fase *in vitro* do sistema tripartite e, também durante a condução do experimento em casa de vegetação.

A colonização micorrízica foi determinada nas raízes das plantas 50 dias após o cultivo em sistema tripartite e 50 dias após aclimatização em casa de vegetação. Amostras de fragmentos de raízes de 2 cm foram clareadas em KOH 10 % (p:v), acidificadas com HCl 1 % (v:v) por 24 horas e coloridas com azul de tripano 0,05 % em lactoglicerol (v:v), à 70 °C, e estocadas em lactoglicerol (Phillipis, & Hayman, 1970; Brundett et al., 1996). A percentagem

de colonização do sistema radicular pela observação de estruturas micorrízicas, foi feita sob microscópio estereoscópio em placas reticuladas.

Cinquenta dias após o cultivo em sistema tripartite e 60 dias após aclimatização em casa de vegetação foram determinados a massa fresca e seca, o diâmetro e a altura do pseudocaule e a área foliar. A massa seca da parte aérea foi determinada após secagem até peso constante à 70 °C em estufa com ventilação forçada e, posteriormente, moída em moinho Willey com peneira de 0,25 mm de malha para determinação da concentração de fósforo (P), potássio (K), magnésio (Mg) e cálcio (Ca).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância em nível de 5 % de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sistema de cultivo tripartite *in vitro*

Os cultivares de bananeira Prata-Anã e FHIA 01 apresentaram, visualmente, o sistema radicular bem desenvolvido após o enraizamento *in vitro*, em meio de cultura. A taxa de sobrevivência foi de 100 % durante o estabelecimento do sistema tripartite para todas as plantas, inoculadas ou não, das duas cultivares.

O inóculo monoxênico de *G. clarum* evidenciou sua capacidade de colonizar o sistema radicular, no ambiente *in vitro*, proporcionando a formação de estruturas características da simbiose micorrízica como arbúsculos, hifas e esporos. Inóculo de mesma origem de *G. clarum* já havia formado associação com morangueiros micropropagado, também no ambiente *in vitro* (Meira, 2004). Estudos têm mostrado que *G. intraradices* produzido em raízes de cenoura transformadas é capaz de estabelecer a associação micorrízica com plantas de tomate propagadas em cultura autotrófica *in vitro* e em morangueiro micropropagado em sistema de cultura tripartite (Elmeskaoui et al., 1995;). Esse tipo de inóculo de *G. intraradices* também foi utilizado com sucesso para inoculação em mudas micropropagadas de bananeira em casa de vegetação (Declerck et al., 2002; Jaizme-Vega et al., 2003).

As percentagens de colonização das raízes das duas cultivares não diferiram entre si, ao final do sistema de cultura tripartite, e foi de 30 % e 34 % para Prata-Anã e FHIA 01, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Massa fresca (g) e colonização micorrízica do sistema radicular de mudas de bananeiras, cultivar Prata-Anã e FHIA 01, inoculadas com *Glomus clarum* (Gc) ou não (Cont) em sistema tripartite *in vitro*, após 50 dias.

Cultivar	Sistema radicular		Colonização (%)
	Massa fresca (g)		
	Gc	Cont	
Prata-Anã	2,75 aA	2,15 aA	30 A
FHIA 01	1,93 aB	1,41 aB	34 A

- Médias seguidas da mesma letra minúscula, na linha ou letra maiúscula na mesma coluna, não diferem entre si, pelo teste F, a 5 % de probabilidade.

Em sistema de cultura tripartite, raízes de morangueiro apresentaram 22 % e 100 % de colonização, 23 e 30 dias respectivamente, após inoculação com *G. intraradices*, produzido monoxenicamente, em ambiente enriquecido com CO₂ (Elmeskaoui et al., 1995; Hernández-Sebastia et al., 1999). A variabilidade de resultados observados pode ser atribuída à interação planta-fungo, que não restringe o simbiote de exercer o seu papel benéfico à planta. Como exemplo, Hernández-Sebastia et al. (1999) obtiveram 22 % de colonização, considerada baixa, mas o efeito benéfico do fungo sobre a planta foi evidenciado pelo maior desenvolvimento das plantas inoculadas, mostrando que a percentagem de colonização pode não refletir em maiores efeitos benéficos para as plantas.

Outro fator importante a ser considerado para o estabelecimento da micorrização *in vitro*, é o enriquecimento deste ambiente com compostos estimulatórios para o fungo (Bécard & Piche, 1989; Elmeskaoui et al., 1995; Fortin et al., 2002; Diop, 2003). O ambiente *in vitro* apresenta características

peculiares, como alta umidade relativa, baixa troca gasosa e produção de etileno (Kladleček et al., 2001). O enriquecimento do ambiente com CO₂ tem mostrado resultados satisfatórios na micorrização, fazendo-se necessário devido ao escasso CO₂ produzido e reciclado, eficientemente, em ambiente fechado e um estimulador do desenvolvimento da simbiose micorrízica (Elmeskaoui et al., 1995; Meira, 2004). Em nossos experimentos, a utilização da embalagem com abertura asséptica, proporcionou maior troca gasosa entre o ambiente *in vitro* e *ex vitro*, sem acarretar maiores problemas como as contaminações. Esse benefício pôde ser observado pelo estabelecimento do sistema por 50 dias com ausências de sintomas visuais. Esta embalagem também foi eficiente para micorrização *in vitro* de maracujazeiro amarelo pelo mesmo sistema descrito (Moreira et al., 2007) .

A inoculação do FMA não interferiu a massa fresca do sistema radicular de Prata-Anã e FHIA 01 (Tabela 1). Entretanto, a massa fresca das raízes da Prata-Anã inoculadas com o fungo, apresentou um incremento quando comparadas com as raízes da FHIA 01 inoculadas. A massa fresca das raízes da Prata-Anã não inoculadas foi maior que o da FHIA 01 quando não recebeu o inóculo (Tabela 1).

Ao final da micorrização *in vitro* não houve diferença entre a massa fresca e seca, altura, área foliar total e diâmetro do pseudocaule da parte aérea das plantas inoculadas ou não inoculadas de ambas os cultivares (Tabela 2). No ambiente *in vitro* não há efeito da inoculação do FMA, pois não se caracteriza um ambiente de estresse em relação à nutriente, água, temperatura, situações em que levaria o FMA a auxiliar a planta.

Tabela 2. Massa fresca, massa seca, Altura, área foliar total e diâmetro do pseudocaule da parte aérea de bananeiras dos cultivares de bananeiras Prata-Anã e FHIA 01, inoculadas ou não com *Glomus clarum*, no sistema de cultura tripartite, após 50 dias.

Características	Inoculação com <i>G. clarum</i>	Cultivar	
		Prata-Anã	FHIA 01
Massa fresca (g)	+	3,78 Aa	3,95 Aa
	-	4,52 Aa	4,06 Aa
Massa seca (g)	+	0,42 Aa	0,30 Ab
	-	0,45 Aa	0,34 Ab
Altura (cm)	+	17,70 Aa	17,3 Ab
	-	17,61Aa	17,23 Aa
Área foliar total (cm ²)	+	78,20 Aa	64,35 Ab
	-	58,04 Ab	64,12 Aa
Diâmetro do pseudocaule (mm)	+	0,79 Ab	0,94 Aa
	-	0,81 Aa	0,85 Aa

Para uma mesma característica, médias seguidas da mesma letra maiúscula, na coluna ou da mesma letra minúscula, na linha, no mesmo parâmetro, não diferem entre si, pelo teste F, a 5 % de probabilidade.

As plantas do cv. Prata-Anã apresentaram incremento na massa seca quando comparadas com o cv. FHIA 01 inoculadas com *G. clarum* ou não. A área foliar total da Prata-Anã inoculada com *G. clarum* foi maior, do que a área foliar da FHIA 01 (Tabela 2). Entretanto, as plantas FHIA 01 apresentaram incremento somente na área foliar total, quando não inoculadas com *G. clarum*, e no diâmetro do pseudocaule quando inoculadas (Tabela 2).

Condições ambientais impostas durante a cultura de tecido incluem: meio de cultura artificial, com minerais, reguladores de crescimento, carboidratos, baixa intensidade luminosa, alta umidade relativa e baixa troca gasosa. Essas condições particulares induzem mudanças fisiológicas,

morfológicas e anatômicas e, em alguns casos, sistema radicular ineficiente das plantas micropropagadas (Kadleček et al., 2001; Estrada-Luna & Davies, 2003).

O crescimento da bananeira no campo ou em casa de vegetação é dependente de vários fatores, entre eles as características inerentes do cultivar (Leite et al., 2003). A Prata-Anã é um dos cultivares com maior área plantada no Brasil e possui grande aceitação no mercado interno (Souza, 2007). A FHIA 01 apresenta características semelhante ao cv. Prata-Anã e é resistente à Sigatoka Negra (Souza, 2007). Experimentos em campos na Zona da Mata Mineira mostraram que os genótipos Prata-Anã e a FHIA 01 foram os mais vigorosos quando comparadas com outros genótipos testados durante 3 ciclos da cultura (Oliveira et al., 2007). Entretanto, a Prata-Anã apesar de ter tido maior número de folhas sofreu drástica redução do crescimento, em resposta a suscetibilidade à sigatoka amarela (Oliveira et al., 2007).

Existem vários relatos na literatura evidenciando diferentes respostas quanto ao crescimento para os cv. FHIA 01 e Prata-Anã, em Minas Gerais e Bahia (Gomez & Nóbrega, 2000; Leite et al., 2003). A variação de resultados é explicada pela diferenças climáticas e características de cada genótipo (Leite et al., 2003).

Trabalhos com micorrização *in vitro* têm demonstrado que os FMA podem ou não proporcionar incremento no crescimento e desenvolvimento das plantas e sistema radicular mais extensivo (Elmeskaoui et al., 1995; Hernández-Sebastia et al., 1999). Em caso afirmativo, demonstra que a micorriza tem efeito no crescimento da parte aérea e sistema radicular da planta e este efeito pode representar pré-adaptação à aclimatização. Entretanto, a ausência de promoção de crescimento, pode estar relacionada

com a baixa dependência micorrízica proporcionada pelas condições controladas do ambiente *in vitro* e a falta de estímulos para crescimento fúngico, como exemplo, enriquecimento do ambiente com CO₂ e exsudados radiculares.

A micorriza foi estabelecida *in vitro*, entretanto não foi observado efeito benéfico do fungo sobre os parâmetros de crescimento avaliados entre as duas cultivares, quando comparado com as plantas controle, entretanto o cv. Prata-Anã, respondeu à inoculação de *G. clarum* e foi superior à FHIA 01.

Aclimatização das plantas

As plantas, das duas cv. de bananeira produzidas *in vitro*, inoculadas ou não com *G. clarum*, obtiveram 100 % de sobrevivência no período de aclimatização. No momento do transplântio para o vaso com substrato, foi observado que o sistema radicular estava bem desenvolvido. O mesmo sucesso da fase de aclimatização foi obtido para o cv. Prata-Anã micropropagado não inoculado (Pereira et al., 2005). Estudos conduzidos com bananeiras do cultivar Terra micropropagadas, em sistema de cultivo de biorreator, obtiveram 70 % de sobrevivência na fase de aclimatização (Lemos et al., 2001). Quando transferidas para a aclimatização, plantas enraizadas *in vitro* são submetidas a condições de alta transpiração associados às características das plantas produzidas *in vitro*, perdem água rapidamente ocasionando altas taxas de mortalidades, o que não foi observado neste trabalho (Lemos et al., 2001; Pereira et al., 2005).

As plantas inoculadas apresentaram colonizações micorrízicas, com estruturas típicas como arbúsculos, vesículas e esporos (Figura 2).

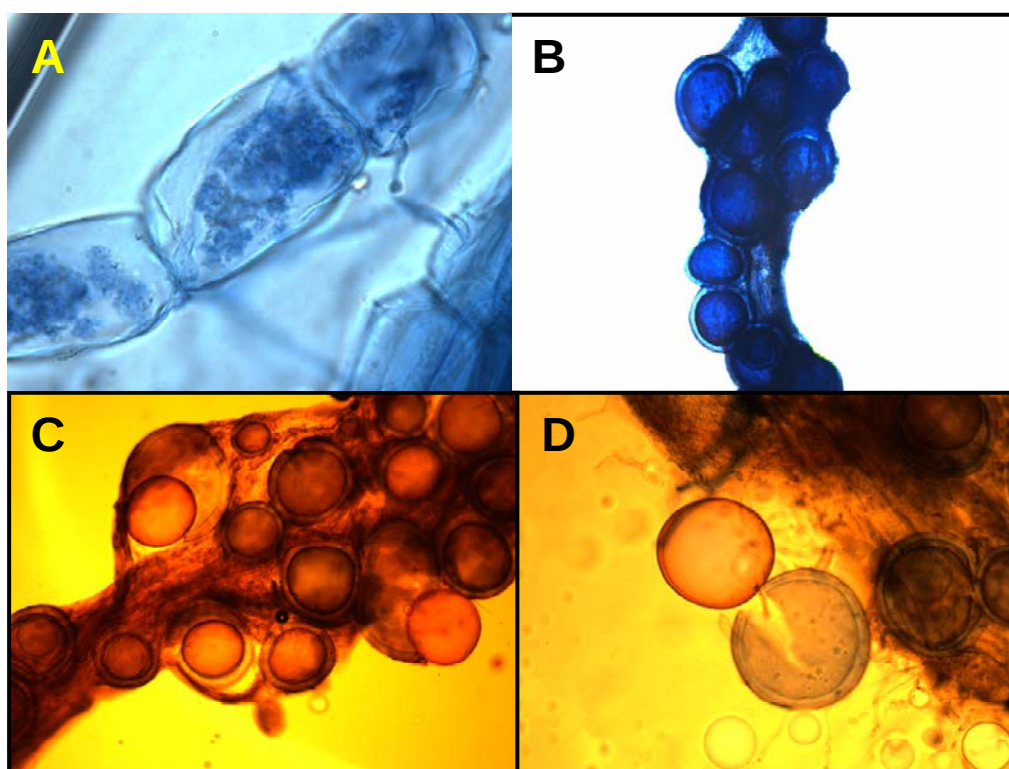


Figura 2. Estruturas micorrízicas formadas, após 50 dias, em raízes de bananeira micropropagadas, micorrizadas *in vitro* por *Glomus clarum* e aclimatizadas em casa de vegetação. (A) Arbúsculo. (B) Raízes contendo no seu interior esporos de *G. clarum*. (C) Esporos formados no interior das raízes em Reagente de Melzer. (D) Detalhe do rompimento da parede do esporo de *G. clarum* em Reagente Melzer.

Raízes do cv. Prata-Anã apresentaram colonizações micorrízicas maiores que as raízes da FHIA (Tabela 3). A massa fresca do sistema radicular das plantas Prata-Anã e FHIA 01 foi maior tanto nas plantas inoculadas em relação as não inoculadas (Tabela 3). O cv. Prata-Anã inoculada ou não com FMA inoculada apresentou maior massa fresca do seu sistema radicular quando comparada com o cultivar FHIA 01 (Tabela 3), podendo ser uma característica inerente à cultivar.

Tabela 3. Massa fresca (g) e colonização micorrízica (%) do sistema radicular dos cultivares Prata-Anã e FHIA 01 inoculadas com *Glomus clarum* (Gc) ou não (Cont) após 60 dias em casa de vegetação.

Cultivar	Sistema radicular		Colonização(%)
	Massa fresca (g)		
	Gc	Cont	
Prata-Anã	18,24 aA	15,9 bA	66 A
FHIA 01	14,75 aB	9,04 bB	50 B

Médias seguidas da mesma letra minúscula, na linha, da mesma letra maiúscula na coluna, não diferem entre si, pelo teste F, a 5 % de probabilidade.

As plantas do cv. Prata-Anã e FHIA 01 inoculadas com *G.clarum* apresentaram maiores valores de massa fresca e seca da parte aérea, altura e diâmetro do pseudocaule quando comparadas com as plantas não inoculadas (Tabela 4). Entretanto, o cultivar Prata-Anã apresentou sempre valores maiores, em todas as características avaliadas quando comparada a FHIA 01 (Tabela 4).

A inoculação com FMA em mudas de bananeira micropropagadas tem proporcionado melhor aclimatização, maior resistência ao ataque de nematóides, maior tolerância a estresses, maior crescimento e absorção de

nutrientes e maiores taxas fotossintéticas e transpiratória, que propiciam conseqüentemente um melhor vigor e desenvolvimento das plantas (Jaizme-Vega et al., 1997; Yano-Melo et al., 1999; Declerck et al., 2002; Leal et al., 2005; Borges et al., 2007).

Tabela 4. Massa fresca (g), massa seca (g), Altura (cm), área foliar (cm²) e diâmetro do pseudocaule (mm) da parte aérea dos cultivares Prata-Anã e FHIA 01 inoculadas com *Glomus clarum* (Gc) ou não (Cont), após 60 dias em casa de vegetação.

.Características	Inoculação com <i>G. clarum</i>	Cultivar	
		Prata-Anã	FHIA 01
Massa fresca (g)	+	16,87 Aa	13,95 Ab
	-	15,45 Ba	6,75 Bb
Massa seca (g)	+	1,80 Aa	1,43 Ab
	-	1,47 Ba	0,77 Bb
Altura (cm)	+	19,00 Aa	16,25 Ab
	-	18,00 Ba	11,00 Bb
Área foliar total (cm ²)	+	7,20 Aa	5,00 Ab
	-	6,30 Aa	4,50 Ab
Diâmetro do pseudocaule (mm)	+	1,63 Aa	1,46 Aa
	-	1,47 Ba	1,00 Bb

Para cada característica avaliada, médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna, ou de mesma letra minúscula, na linha, não diferem entre si, pelo teste F, a 5 % de probabilidade.

Durante o crescimento inicial da planta micropropagada a inoculação com FMA pode contribuir para o melhor desenvolvimento do sistema radicular, que são fracos e ineficientes quando formados *in vitro*. Os FMA promovem o crescimento e o desenvolvimento da raiz tornando-a mais eficiente e, conseqüentemente, melhorando a absorção de vários nutrientes (Lins et al., 2003).

Diferenças nos conteúdos de P, K e Mg foram encontrados na parte aérea de plantas de bananeira micropropagadas (Tabela 5). Plantas micorrizadas dos cultivares Prata-Anã e FHIA 01 apresentaram maiores

conteúdos de P, K e Mg do que as controles (Tabela 5). Entretanto, o conteúdo de Ca na parte aérea não diferiu entre os cultivares Prata-Anã e FHIA 01 inoculados ou não com o FMA (Tabela 5).

Tabela 5. Conteúdo dos nutrientes fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) da parte aérea dos cultivares Prata-Anã e FHIA 01 inoculadas (Gc) ou não (Cont) com *Glomus clarum*, 60 dias após aclimatização em casa de vegetação.

Cultivar	Inoculação	P	K	Ca	Mg
		(dag kg ⁻¹)			
Prata-Anã	Gc	0,083a	1,39a	0,32a	0,43a
	Cont	0,065b	1,29b	0,31a	0,38b
FHIA 01	Gc	0,093a	1,80a	0,33a	0,58a
	Cont	0,063b	1,27b	0,33a	0,53b

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, dentro do mesmo cultivar, não diferem entre si pelo teste F a 5 % de probabilidade.

O maior conteúdo de nutrientes em plantas micorrizadas obtido em nosso trabalho, também já foi observado por outros autores em bananeiras (Yano-Melo et al., 1999; Jaizme-Vega et al., 2003; Lins et al., 2003; Leal et al., 2005).

Micorrizas arbusculares são reconhecidas por sua habilidade em estimular o crescimento de plantas, por incremento na absorção de nutrientes (Berbara et al., 2006). As hifas longas e finas funcionam como extensão das raízes das plantas, uma vez que, devido à sua grande capacidade de ramificação, exploram o solo, realizando absorção de água e nutrientes

minerais, que são transferidos para as plantas por meio de estruturas intracelulares, efêmeras, denominadas arbúsculos (Berbara et al., 2006). Dessa forma, o maior crescimento das mudas de bananeiras micorrizadas pode ser atribuído ao elevado acúmulo de nutrientes, devido ao aumento da superfície de absorção conferido às hifas e, conseqüentemente, maior taxa fotossintética, maior eficiência de uso da água pelas plantas e maior atividade de enzimas como nitrato redutase, fosfatase ácida e glutamina (Leal et al., 2005; Berbara et al., 2006).

Bananeiras aclimatizadas inoculadas com *Acaulospora scrobiculatum* e *Glomus etunicatum*, apresentam maiores teores de Cu, Na, Mg, Ca e Zn e, conseqüentemente, maior massa de raiz e parte aérea e área foliar (Yano-Melo et al., 1999). Por esses benefícios os fungos são utilizados como estratégia na fase de aclimatização, devido ao aumento de absorção de nutrientes e água, tornado-se plantas vigorosas (Declerck et al., 2002; Lins et al., 2003; Kapoor et al., 2008).

As respostas fisiológicas das plantas são resultados das interações do ambiente, planta e fungo. Dessa forma, o aumento na taxa de crescimento da planta não está somente relacionada com a colonização do fungo, mas também, com outros fatores como extensão do micélio, e transporte de nutrientes do solo para o hospedeiro (Yano-Melo et al., 1999). O aumento da área foliar está intimamente associado com o aumento da taxa fotossintética de plantas inoculadas com FMA (Estrada-Luna et al., 2001).

As diferenças no nível de colonização radicular são provavelmente atribuídas a diferenças na dependência micorrízica entre variedades de bananeiras e fatores abióticos (Yano-Melo et al., 1999).

Esses resultados mostram que a colonização micorrízica promoveu um crescimento e o desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular durante a fase de aclimatização e os cultivares Prata-Anã e FHIA 01 responderam à inoculação do FMA.

4. CONCLUSÕES

- O sistema de cultivo tripartite foi obtido com sucesso.
- O inóculo monoxênico de *G. clarum* em raízes de cenoura transformada, promove a colonização radicular, de Prata-Anã e FHIA 01 micropropagada, no sistema de cultivo tripartite.
- Houve efeito benéfico da micorrização no final da aclimatização nos dois cultivares.
- Os cultivares Prata-Anã e FHIA 01 inoculados com *G. clarum* apresentaram maiores valores nos parâmetros avaliados e, também, no conteúdo de nutrientes.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alguacil, M. M.; Hernández, J. A.; Caravaca, F.; Portillo, B.; Roldán, A. Antioxidant enzyme activities in shoots from three mycorrhizal shrub species afforested in a degraded semi-arid soil. **Physiologia Plantarum**, 118: 562-570, 2003.
- Azcón-Aguilar, C. & Barea, J. M. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. **Scientia Horticulturae**, 68:1-24. 1997.
- Azcón-Aguilar, C.; Barceló, A.; Vidal, M. T.; De la Vina, G. Further studies on the influence of mycorrhizae on growth and development of micropropagated avocado plants. **Agronomie**, 12:837-840, 1992.
- Bécard, G. & Fortin, A. Early events of vesicular arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. **New Phytologist**, 108: 211-218, 1988.
- Berbara, R. L. L.; Souza, F. A.; Fonseca, H. M. A. C. **Fungos micorrízicos arbusculares: muito além da nutrição**. In: Nutrição Mineral de plantas, 54-79, 2006.
- Borges, A. J. S.; Trindade, A. V.; Matos, A. P.; Peixoto, M. F. S. Redução do mal-do-panamá em bananeira-maçã por inoculação de fungo micorrízico arbuscular. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 42:35-41, 2007.
- Brasil. Instrução Normativa nº 17 de 31 de maio de 2005. Aprova os procedimentos para caracterização, implantação e manutenção de área livre de sigatoka negra e os procedimentos para implantação e manutenção do sistema de mitigação de risco para sigatoka negra – *Mycosphaerella fijiensis*. 2005. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/>> Acesso em julho de 2008.
- Brundrett, M.; Bougher, N.; Dell, B.; Grove, T.; Malajczuk, N. **Working with Mycorrhizas in Florestry and Agriculture**. ACIAR Monograph, 374p. 1996.
- Clark, R. B. Characterization of phosphatases of intact maize roots. **Journal Agriculture Food and Chemistry**, 23: 458-460, 1975.
- Costa, F. A. **Micorrizas arbusculares e enzimas do estresse oxidativo em raízes de cenoura transformada e em morangueiro**. Viçosa: UFV, 2003.

- 92 p. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2003.
- Declerck, S.; Risede, J. M.; Delvaux, B. Greenhouse response of micropropagated bananas inoculated with *in vitro* monoxenically produced arbuscular mycorrhizal fungi. **Scientia Horticulturae**, 93:301-309, 2002.
- Declerck, S.; Strullu, D. G.; Plenchette, C. *In vitro* mass-production of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus versiforme*, associated with Ri T-DNA transformed carrot roots. **Mycological Research**, 100: 1237-1242, 1996.
- Diop, T. A. ***In vitro* culture of arbuscular mycorrhizal fungi: advances and future prospects. African Journal of Biotechnology**, 2:692-697, 2003.
- Diop, T. A., Plenchette, C., Strullu, D. G. *In vitro* culture of sheared mycorrhizal roots. **Symbiosis**, 17: 217-227, 1994.
- Elmeskaoui, J. P.; Damont, M. J.; Poulin, Y.; Piché, Y.; Desjardins, A. A tripartite culture system for endomycorrhizal inoculation of micropropagated strawberry plantlets *in vitro*. **Mycorrhiza**, 5: 313-319, 1995.
- Estrada-Luna, A. A. & Davies, J. F. T. Arbuscular mycorrhizal fungi influence water relations, gas exchange, abscisic acid and growth of micropropagated chile ancho pepper (*Capsicum annuum*) plantlets during acclimatization and post-acclimatization. **Journal of Plant Physiology**, 160: 1073-1083, 2003.
- FAO. FAOSTAT. Database results. 2005. Disponível em <<http://www.foa.org.br/>>. Acesso em julho de 2008.
- Fortin, J. A.; Bécard, G.; Declerck, S.; Dalpé, Y.; St. Arnaud, M.; Coughlan, A. P.; Piché, Y. Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. **Canadian Journal of Botany**, 80:1-20, 2002.
- Gomez, J. A. & Nobrega, A. C. Comportamento de cultivares e híbridos de bananeira na região produtora do Estado do Espírito Santo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 1:11–13, 2000.
- Hernandez, J. A.; Talavera, J. M.; Martinez-Gomez, P.; Dicenta, F.; Sevilla F. response of antioxidative enzymes to plum pox vírus in two apricot cultivars. **Physiology Plant**, 111:313-321, 2001.
- Hernández-Sebastia, C.; Piché, Y.; Desjardins, Y. Water relations of whole strawberry plantlets *in vitro* inoculated with *Glomus intraradices* in a tripartite culture system. **Plant Science**, 143:81-91, 1999.

- Hooker, J. E.; Gianinazzi, S.; Vestberg, M.; Barea, J. M.; Atkinson, D. The applications of arbuscular mycorrhizal fungi to micropropagated systems: an opportunity to reduce inputs. **Agricultural Science**, 3:227-232, 1994.
- Jaizme-Vega, M.C.; Rodríguez-Romero, A.S.; Hermoso, C. M.; Declerck, S. Growth of micropropagated bananas colonized by root-organ culture produced arbuscular mycorrhizal fungi entrapped in Ca- alginate beads. **Plant and Soil** 254: 329–335, 2003.
- Kapoor, R.; Sharma, D.; Bhatnagar, A. K. Arbuscular mycorrhizae in micropropagation in systems and their potential applications. **Scientia Horticulturae**, 116:227–239, 2008.
- Kadlecek, P. Ticha, I.; Haisel, D.; Capkova, V.; Schäfer, C. Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. **Plant Science**, 161:695-701, 2001.
- Leal, P. L.; Martins, M. A.; Rodrigues, L. A.; Schiavo; J. A. Crescimento de mudas micropropagadas de bananeira micorrizadas em diferentes recipientes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 27:84-87, 2005.
- Leite, J. B.; Silva, V. S. O.; Alves, E. J.; Lins, R. D.; Jesus, O. N. Caracteres da planta e do cacho de genótipos de bananeira, em quatro ciclos de produção, em Belmonte, Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 25:443-447, 2003.
- Lemos, E., E., P.; Ferreira, M., S.; Alencar, L., M., C.; Oliveira, J., G., L.; Magalhães, V., S. Micropropagação de clones de banana cv. Terra em biorreator de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 23:482-487, 2001.
- Lins, G. M. L.; Trindade, A. V.; Rocha, H. S. Utilização de *Gigaspora margarita* em plantas de bananeira em diferentes estádios de enraizamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 25:143-147, 2003.
- Meira, L. S. **Atividade de enzimas do estresse oxidativo em morangueiro micropropagado e inoculado com fungos micorrízicos arbusculares durante a aclimatização**. Viçosa: UFV, 2004. 64 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2004.
- Moraes, R. M. Andrade, Z.; Bedir, E.; Dayan, F. E.; Lata, H.; Khan, I.; Pereira, A. M. S. Arbuscular mycorrhizal improves acclimatization and increases lignan

- content of micropropagated mayapple (*Podophyllum peltatum* L.). **Plant Science**, 166:23-29, 2004.
- Moreira, B. C. ; Meira, L. S. ; Carvalho, A.M.X ; Otoni, W. C. ; Kasuya, M. C. M. **Sistema de Micorrização in vitro em Maracujazeiro Micropropagado**. In: XXXI Congresso Brasileiro de Ciencia do Solo, 2007, Gramado. XXXI Congresso Brasileiro de Ciencia do Solo - Conquistas e Desafios da Ciencia do Solo Brasileira, 2007.
- Murashige, T. & Skoog, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15:473-497, 1962.
- Oliveira, C. A. P.; Peixoto, C. P.; Silva, S. O.; Ledo, C. A. S.; Salomão, L. C. C. Genótipos de bananeira em três ciclos na Zona da Mata Mineira. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 42:173-181, 2007.
- Pereira, M. C. T.; Nietzsche, S.; França, A. C.; Nunes, C. F.; Lima, C.; Gonçalves, V. D.; Salles, B. P.; Morais, D. L. B.; Kobayashi, M. K. Aclimatização de mudas micropropagadas de bananeira sob diferentes condições de luminosidade. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 27:238-240, 2005.
- Phillipis, J. M. & Hayman, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transaction of the British Mycological Society**, 55:158-161, 1970.
- Pons, F.; Gianinazzi-Person, V.; Gianinazzi, S.; Navavatel, J. C. Studies of VA mycorrhizae *in vitro*: mycorrhizal synthesis of axenically propagated wild cherry (*Prunus avium* L.) plants. **Plant and Soil**, 71:217-221, 1983.
- Prece, J. E. & Sutter, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation, technology and application**. London: Kluwer Academic, 71-93, 1991.
- Rai, M. K. Current advances in mycorrhization in micropropagation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 37:158-167, 2001.
- Ritzinger, C. H. S. P.; Borges, A. L.; Ledo, C. A. S.; Caldas, R. C. Fitonematóides associados a bananais 'pacovan' sob condição de cultivo irrigado: relação com a produção. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 29:677-680, 2007.

- Sanada, M. Micropropagation of semitropical crop and its application to cultivation in Okinawa. In: Thiquynh, N.; Uyen, N.V. (Eds.). **Adapted propagation techniques for commercial crops of the tropics**. Stockholm, 101-105, 1993.
- Santos, B. A.; Maia, L. C.; Cavalcante, U. M. T.; Correia, M. T. S.; Coelho, L. C. B. B. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi and soil phosphorus level on expression of protein and activity of peroxidase on passion fruit roots. **Brazilian Journal of Biology**, 61: 693-700, 2001.
- Schubert, A. & Lubraco, G. Mycorrhizal inoculation enhances growth and nutrient uptake of micropropagated apple rootstocks during weaning in commercial substrates of high nutrient availability. **Applied Soil Ecology**, 15:113-118, 2000.
- Souza, D. S. **Micropropagação das bananeiras Prata-Anã e FHIA 01 a partir de explantes provenientes de plantas tratadas com paclobutrazol**. Viçosa: UFV, 2007. 45 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2007.
- ST-Arnaud, M., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M., Fortin, J. A. Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots. **Mycological Research**, 100: 328-332, 1996.
- Yano-Melo, A. M.; Júnior, O. J. S.; Lima-Filho, J. M.; Melo, N. F.; Maia, L. C. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the acclimatization of micropropagated banana plantlets. **Mycorrhiza**, 9:119-123, 1999.

CAPÍTULO III

Efeito protetor do fungo micorrízico arbuscular (*Glomus clarum*) aos nematóides das galhas (*Meloidogyne incognita*) em bananeiras micropropagada

CAPÍTULO III

Efeito protetor do fungo micorrízico arbuscular (*Glomus clarum*) aos nematóides das galhas (*Meloidogyne incognita*) em bananeiras micropropagada

RESUMO

Além dos efeitos nutricionais, da maior tolerância de plantas a condições de estresse biótico e abiótico, podem ser atribuídos, também, aos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) proteção das plantas contra danos causados por patógenos do solo, a exemplo, dos nematóides. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de *Glomus clarum* na reprodução do nematóide das galhas (*Meloidogyne incognita*), e o crescimento de plantas de bananeira micropropagadas. No primeiro experimento, ovos de *M. incognita* foram aplicados no solo em vasos com o cv. Prata-Anã e FHIA 01 previamente colonizadas pelo FMA e após 60 dias foram avaliados massa fresca da parte aérea e sistema radicular, colonização micorrízica, número de galhas e de ovos. No segundo, experimento foi montado um sistema de compartimentalização de raízes para divisão das raízes em dois compartimentos distintos para avaliar-se o papel dos FMAs na indução resistência localizada e sistêmica aos nematóides. No último, foi montado o mesmo sistema de compartimentalização, descrito acima, para verificar a atividade da peroxidase (PO) e fenilalanina amônia liase (PAL) das raízes, nos compartimentos distintos, antes (0), 4 e 7 dias após a inoculação do nematóide. O FMA promoveu crescimento dos dois cultivares e reduziu o número de galhas e de ovos do sistema radicular. *G. clarum* tem efeito localizado sobre o nematóide e compensa o dano causado no sistema radicular por esse patógeno. As atividades enzimáticas foram maiores na presença do FMA e nematóide. Pôde-se concluir que os FMAs promovem o crescimento de plantas de bananeira micropropagadas, protegem-na contra nematóides pelo efeito localizado e que as enzimas relacionadas aos estresses podem contribuir para um efeito localizado.

Palavras-chaves: micorriza arbuscular, micropropagação, nematóide, resistência, peroxidase, fenilalanina amônia liase, *Musa* sp.

1. INTRODUÇÃO

O papel preponderante das micorrizas na melhoria da nutrição mineral das plantas é bastante reconhecido, entretanto, este não se resume no único benefício da simbiose. Outros efeitos benéficos também são atribuídos aos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), tais como o aumento da resistência e de tolerância a patógenos, redução da incidência e severidade de doenças e redução do número de patógenos de solo (Azcón-Aguilar & Barea, 1996; Cordier, et al., 1998; Pozo et al., 2002; Barea et al., 2005; Elsen et al., 2008).

Os nematóides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.) são um grupo de substancial importância para a cultura da bananeira, onde as perdas por tais parasitas podem chegar a 100 % quando o seu controle não é efetuado corretamente. Danos nas raízes causados pela penetração do parasita, e a comum ocorrência simultânea de *Fusarium oxysporum*, comprometem a absorção e transporte de água e nutrientes pelo sistema radicular, restringindo assim o crescimento e desenvolvimento da parte aérea (Ritzinger & Fancelli, 2006; Ritzinger et al., 2007).

Após reconhecimento de um patógeno como incompatível, a planta desencadeia várias reações bioquímicas de defesa: ocorre rápida geração de espécies reativas de oxigênio (EOR), seguida da resposta de hipersensibilidade com morte celular programada, e resposta sistêmica adquirida (RSA) (Mittler, 2002; Matamoros et al., 2003; del Rio et al., 2006). O termo EOR é usado para descrever os produtos da remoção seqüencial de elétrons do oxigênio molecular (O_2), gerando o ânion superóxido ($\cdot O_2^-$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($\cdot OH$). As EOR se formam

naturalmente no interior celular, nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomas, como produtos secundários oriundos da fotossíntese e da respiração. Entretanto, são produzidas em excesso logo após o reconhecimento de um patógeno pela planta, produzindo o fenômeno conhecido como “explosão oxidativa” (Mittler, 2002; Matamoros et al., 2003; del Rio et al., 2006).

O dano oxidativo no tecido da planta causado pelas EOS é aliviado ou prevenido pela ação combinada de mecanismos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Estes mecanismos incluem β -carotenos, α -tocoferol, ascorbato, glutathione e enzimas com atividade antioxidativa, tais como superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POX), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), glutathione peroxidase e glutathione redutase (GR). Além das respostas acima, as plantas produzem barreiras físicas como, aumento da lignificação da parede celular e a síntese de compostos fenólicos secundários de defesa, as fitoalexinas, como resultado da expressão de enzimas associadas com o metabolismo secundário, dentre estas a fenilalanina amônia-liase (PAL) enzima chave da via de síntese dos fenilpropanóides/flavonóides (Mittler, 2002; Matamoros et al., 2003; del Rio et al., 2006).

Em relação às respostas bioquímicas de defesa contra o *Meloidogyne incognita*, há aumento da atividade da peroxidase que catalisa a polimerização oxidativa de fenilpropanóides para produzir lignina e está envolvida na ligação cruzada de proteínas da parede celular, contribuindo para o aumento da rigidez que está envolvida com a lignificação da parede celular vegetal (Kuzniak & Urbanek, 2000).

As reduções do crescimento em consequência ao ataque do nematóide podem ser minimizadas pelos FMAs, que também afetam a reprodução dos

nematóides. Os FMAs podem reduzir a ovoposição, o número de indivíduos no sistema radicular de plantas infectadas, o número de galhas e podem ainda, aumentar a tolerância das plantas ao ataque do patógeno por reduzir o desenvolvimento dos nematóides (Pinochet et al., 1996; Elsen et al., 2003; Hol & Cook, 2005; Elsen et al., 2008). Inoculação de FMAs em mudas de bananeira conferem maior proteção e/ou tolerância contra *Meloidogyne javanica*, *Radopholus simillis* e *Pratylenchus coffeae* e benefícios para o crescimento e desenvolvimento das mudas, além de redução dos danos na raiz e da sua densidade populacional (Pinochet et al., 1996; Elsen et al., 2003).

Entretanto, a interação planta-fungo-parasita ocasiona diversos efeitos e essa variabilidade de respostas pode ser explicada pela especificidade do trinômio e alterações no ambiente, genótipo da planta, espécie do nematóide e isolado fúngico podem levar à diversidade de resultados (Hol & Cook, 2005).

No entanto, é primordial o sucesso do estabelecimento da micorriza para o controle dos nematóides (Elsen et al., 2001; Elsen et al., 2003). Plantas em simbiose micorrízica sofrem alterações bioquímicas, fisiológicas e moleculares relacionados com o sistema de defesa da planta para o estabelecimento da simbiose (Garcia-Garrido & Ocampo, 2002). Entretanto, as respostas de defesa da planta são limitadas, transientes e restritas a células específicas, mas as reações nas plantas têm semelhanças, do ponto de vista fisiológico, com as reações que se observam durante a colonização por patógenos (Gianinazii-Pearson, 1996; Garcia-Garrido & Ocampo, 2002; Lambais et al., 2003). A colonização micorrízica atua como sistema primário de defesa da planta ao ataque do patógeno (Elsen et al., 2008).

As mudanças fisiológicas na planta causada pelos simbiossantes previnem o ataque de patógeno e ativam mecanismos de defesa, uma vez que proteínas relacionadas com a patogênese, fitoalexinas e lignificação da parede celular têm sido relatadas em plantas com micorrizas em locais distantes da simbiose indicando, assim, a resistência sistêmica (Cordier, et al., 1998; Pozo et al., 2002; Selosse et al., 2004; Elsen et al., 2008). Dessa forma, os FMAs podem conferir a planta aumento da resistência contra patógenos incluindo os nematóides por meio da ativação de mecanismos relacionados à defesa (Pozo et al., 2002; Elsen et al., 2003, Elsen et al., 2008). Além de indução de resistência, como mecanismos envolvidos, podem ser considerados a melhoria do estado nutricional da planta hospedeira, compensação do dano causado pelo patógeno, mudanças anatômicas e morfológicas no sistema radicular do hospedeiro e competição pelo sítio de infecção e sítio de colonização (Azcón-Aguilar & Barea, 1996; Linderman, 1994; Pozo et al., 2002).

Os FMAs induzem formação de resistência localizada e sistêmica contra o patógeno. É considerada resistência localizada a inabilidade de o patógeno invadir células hospedeiras contendo arbúsculos e a resistência sistêmica é caracterizada como redução do dano na raiz e redução do desenvolvimento do patógeno em tecidos não colonizados do sistema radicular (Cordier, et al., 1998; Pozo et al., 2002).

O aumento na indução de resistência pode ser acompanhado de inoculação na planta com um indutor antes da infecção do patógeno. *Rhizobium* pode ser considerado como agente indutor de resposta de defesa e reduzir a severidade da doença, induzindo atividade de peroxidase e acúmulo de compostos fenólicos (Fabry, 2006; Arfaoui et al., 2007).

A manipulação de populações de microrganismos habitantes comuns do solo associada às raízes é uma área de pesquisa promissora, podendo ser uma alternativa efetiva e durável no controle de doenças do sistema radicular de plantas. Microrganismos benéficos que promovem crescimento de plantas e apresentam efeito protetor contra patógenos do solo como os FMAs são considerados de grande potencial para agente de biocontrole.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito dos FMAs, produzidos em condições monoaxênicas, sobre o parasitismo do nematóide das galhas e as atividades das enzimas oxidativas em raízes de bananeira micropropagadas em casa de vegetação associadas ao FMA e ao nematóide.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e cultivo *in vitro*

Para o estabelecimento *in vitro* da cultura, foram utilizadas mudas de bananeira (*Musa* sp.), cultivar Prata-Anã e FHIA 01 cedidas pelo Professor Dalmo Lopes de Siqueira do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG.

As mudas *in vitro* foram transferidas para meio de cultura de multiplicação - MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 8 g L⁻¹ de Ágar e 7 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) e 100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico a pH 5,5. Cinco explantes foram subcultivados em frascos de vidro de 15 x 6 cm contendo 40 mL de meio de multiplicação, vedados com tampa plástica. A fase de multiplicação foi constituída de 5 subcultivos, cada um com duração média de 30 dias, em sala de crescimento à 26±2 °C e 16 horas de fotoperíodo, irradiância de 36 (μmol m⁻² s⁻¹) (Souza, 2007). Ao término do 5º subcultivo, os explantes foram enraizados.

O enraizamento foi realizado em meio de cultura constituído de 50% da concentração original de MS, 15 g L⁻¹ de sacarose e 8 g L⁻¹ de ágar, sem reguladores de crescimento, durante 30 dias. Os explantes foram crescidos em sala de crescimento à temperatura de 26±2 °C, sob 16 horas diárias de luz, irradiância de 36 (μmol m⁻² s⁻¹), fornecida por lâmpadas fluorescentes tipo branca.

2.2. Cultura monoaxênica de FMA

O inóculo *in vitro* de *Glomus clarum* foi produzido em raízes de cenoura transformadas (Bécard & Fortin, 1988), utilizando-se a linhagem de *Agrobacterium rhizogenes* R1601, cedida pelo prof. Wagner Campos Otoni do Laboratório de Cultura de tecidos/BIOAGRO/UFV. Os estoques do inóculo *in vitro* dos FMAs, a partir da coleção do Laboratório de Associações Micorrízicas do Departamento de Microbiologia da UFV, foram mantidos por subcultivos em placas de Petri em meio mínimo, pH 5,5 com 0,4 % de Phytigel® (Sigma Chemical Company EUA) contendo raízes de cenoura transformadas (Bécard & Fortin, 1988), mantidas à 27 °C, no escuro (Costa, 2003).

2.2. Inóculo do nematóide

Ovos de *Meloidogyne incognita* utilizados nos experimentos foram multiplicados e mantidos em raízes de tomateiro cv Santa Clara, em solo e areia na proporção de 1:1 (v:v), em casa de vegetação e cedidos pelo prof. Leandro Grassi de Freitas do Laboratório de Controle Biológico de Fitonematóides - BIOAGRO - UFV. Foi utilizada a metodologia de Boneti & Ferraz (1981) para extração dos ovos.

2.3. Efeito de *Glomus clarum* no controle de *Meloidogyne incognita* em mudas de bananeira micropropagada em casa de vegetação

Ao final de 30 dias de cultivo *in vitro* em meio de enraizamento, as cultivares Prata-Anã e FHIA 01, micropropagadas, foram inoculadas com o FMA *G. clarum* no momento do transplântio, para copos plásticos contendo 100 mL de substrato esterilizado por autoclavagem, composto de solo-vermiculita

(2:1). A inoculação foi realizada utilizando-se como inóculo cubos de gel (meio de cultura) contendo 100 esporos, mas também hifas e raízes de cenoura transformadas e colonizadas com *G. clarum*. Em seguida, as plantas foram transferidas para sala de crescimento, mantidas à temperatura de 26 ± 2 °C, 100 % de umidade relativa, 16 horas diárias de luz e irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, durante 7 dias, quando foram transplantadas para vasos de 1 Kg de capacidade, contendo o mesmo substrato inicial e em seguida foram transferidas para casa de vegetação onde foram mantidas por 60 dias. Após esse período, as plantas foram infestadas com 2.000 ovos de *M. incognita* por vaso em quatro pontos eqüidistantes no solo e mantidas com 60 a 70 % de umidade e aplicação semanal de 50 mL de solução nutritiva de Clarck (Clarck, 1975), com 1/2 da concentração normal de P por plantas micropropagadas em casa de vegetação. As plantas controle não receberam o inóculo fúngico nem o do nematóide. Sessenta dias após a infestação do solo com o nematóide, foram avaliados: massa fresca e seca da parte aérea, massa fresca da raiz, percentagem de colonização micorrízica, número de galhas e ovos de nematóides. A massa seca da parte aérea foi determinada após secagem até peso constante à 70 °C em estufa com ventilação forçada e, posteriormente, moída em moinho Willey com peneira de 0,25 mm de malha para determinação da concentração de fósforo (P), potássio (K), magnésio (Mg) e cálcio (Ca).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 repetições. Os dados foram analisados pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

2.4. Sistema de compartimentalização de raízes de bananeira micropropagada inoculada com *Glomus clarum* e ou *Meloidogyne incognita*

Após o período de enraizamento *in vitro*, as plantas de bananeira foram aclimatizadas em copos plásticos contendo 100 mL de substrato esterilizado por autoclavagem, composto de solo-vermiculita (2:1). Em seguida, as plantas foram transferidas para sala de crescimento, mantidas à temperatura de 26 ± 2 °C, 100 % de umidade relativa, 16 horas diárias de luz e irradiância de 30 a 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, durante 7 dias.

Após esse período, as plantas foram transplantadas para o sistema de compartimentalização de raízes constituído de dois recipientes retangulares de capacidade de 0,5 Kg (8 x 15 cm) de plásticos unidos, lado a lado, formando uma unidade experimental, com um cilindro confeccionado em PVC (poli cloreto de vinila) (4 x 5 cm) para suporte da planta (Figura 1). Ambos continham substrato esterilizado por autoclavagem, composto de solo-vermiculita (2:1). Este sistema foi adaptado de Cordier et al. (1998).

No momento da transferência das plantas para esse sistema, as raízes foram cuidadosamente divididas em duas partes e plantadas em cada lado do recipiente. Cada sistema constituiu de inoculação ou não com o FMA e, ou infestação com os ovos de nematóides (Tabela 1). O inóculo micorrízico, constituído de 100 esporos de *G. clarum*, em cubos de gel, foi introduzido no momento do transplante. Os recipientes foram mantidos em casa de vegetação por 60 dias e após esse período, cada compartimento que receberia o nematóide foi infestado com 1500 ovos de *M. incognita*. O experimento foi constituído de 5 tratamentos com 5 repetições, em delineamento inteiramente casualizado (Tabela 1).

Sessenta dias após a infestação do solo com o nematóide, foram avaliados: massa fresca e seca da parte aérea, massa fresca da raiz, percentagem de colonização micorrízica, número de galhas e ovos de nematóides. A atividade da enzima peroxidase (PO, EC 1.11.1.7) foi determinada nas amostras do sistema radicular conforme descrito por Wuyts et al. (2006).

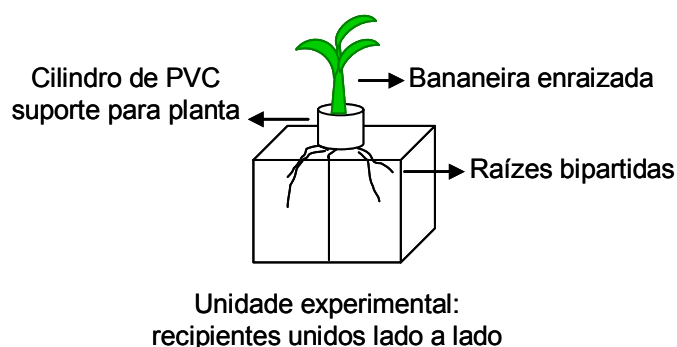


Figura 1. Sistema de compartimentalização de raízes de bananeira.

Tabela 1. Denominação dos tratamentos de acordo com a inoculação com *Glomus clarum* (Gc) (+) ou não (-), ou com ovos de *Meloidogyne incognita* (Mi) (+) ou não (-), no sistema de compartimentalização de raízes de bananeira.

Tratamento	Unidade experimental			
	Compartimento 1		Compartimento 2	
	Gc	Mi	Gc	Mi
T1	+	-	-	-
T2	-	+	-	-
T3	+	-	-	+
T4	+	+	-	-
T5	-	-	-	-

A atividade da peroxidase (PO) foi determinada em amostras de 50 mg de raízes homogeneizadas com igual volume de PVPP e suspensas em 1 mL

de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0 em almofariz de porcelana resfriado a 4 °C. As amostras foram centrifugadas a 16.000g por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante utilizado no ensaio. O volume de 200 µL do extrato enzimático foi adicionado a 250 µL de água, 500 µL de H₂O₂ 30 mM, 500 µL de guaiacol 30 mM e 1500 µL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0 à 25 °C. A mudança na densidade ótica da mistura de reação foi imediatamente registrada a 470 nm por 2,5 minutos com intervalo de 15 segundos. O branco constitui a mistura de reação sem o extrato enzimático. A atividade de PO foi expressa em unidades de absorvância (UA) por minuto por conteúdo de proteína da amostra (UA min⁻¹ mg⁻¹ de proteína) (Menolli et al., 2008).

A determinação de proteínas solúveis das amostras foi realizada segundo o método colorimétrico de Bradford (1976), baseado em equação de curva padrão de albumina bovina 0,5 % (BSA) e leitura da absorbância a 595 nm.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 repetições. Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA e, quando pertinentes, as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

Foram obedecidas as normas de biossegurança estabelecidas pela CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança) para o descarte seletivo adequado de todo o material transgênico envolvido nos experimentos.

2.5. Análises enzimáticas em sistema de compartimentalização de raízes de bananeira micropropagada inoculada com *Glomus clarum* e *Meloidogyne incognita*

Após o período de enraizamento *in vitro* e aclimatização das cultivares Prata-Anã e FHIA 01 foi montado o sistema de compartimentalização de raízes com os mesmos tratamentos, unidade experimental, substrato, inóculo micorrízico e do nematóide como descrito no item 2.4. Entretanto, em 0, 4 e 7 dias após a inoculação do nematóide, as raízes foram analisadas quanto à atividade de PO, descrito no item 2.4, e fenilamônia liase (PAL).

A determinação da atividade enzimática de PAL foi obtida pela homogeneização de 0,5 g de raízes (congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -20 °C) com igual volume de PVPP e suspendida em 5 mL de tampão borato 25 mM, pH 8,8 em almofariz de porcelana resfriado a 4 °C. Os fragmentos de células foram removidos por centrifugação a 24.000g por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante armazenado. Para o ensaio, 200 µL do extrato enzimático obtido foi adicionado a 800 µL de solução de L-fenilalanina 15 mM em tampão borato, 25 mM, pH 8,8 e incubados por 1 hora a 37 °C. A reação foi interrompida com adição de 50 µL de HCl 5M. Após o período de incubação, as amostras foram lidas a 290 nm. A atividade de PAL foi expressa em quantidade (nmol) de ácido cinâmico formado na reação por 1 hora e por conteúdo de proteína da amostra (nmol ácido cinâmico h⁻¹. mg⁻¹ de proteína). A curva padrão de ácido cinâmico foi utilizada (Wuyts et al., 2006).

A percentagem de colonização (Phillipis & Hayman, 1970; Brundrett, 1996) foi determinada no momento da inoculação do nematóide. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 repetições. Os dados obtidos

foram submetidos à ANOVA e, quando pertinentes, as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

3. RESULTADOS

3.1. Efeito de *G. clarum* no controle de *M. incognita* em mudas de bananeira micropropagada em casa de vegetação.

Após 60 dias da inoculação do nematóide, foi quantificada a colonização micorrízica (Tabela 2) e a formação de galhas nas raízes das plantas (Tabela 2). Quanto ao desenvolvimento do sistema radicular não houve diferença significativa entre os cultivares e a presença ou ausência do fungo e o nematóide (Tabela 2). A colonização micorrízica não foi afetada pela presença do nematóide no solo, entretanto, a presença do fungo afetou, significativamente, o número de galhas e o número médio de ovos tanto no cv. Prata-Anã e no cv. FHIA 01 (Tabela 2).

O crescimento da parte aérea (massa fresca) dos cultivares foi aumentado pela inoculação com *G. clarum*, na presença ou ausência do *M. incognita* (Tabela 3). Entretanto, a inoculação do nematóide na ausência da associação micorrízica, reduziu o crescimento da parte aérea do cv. Prata-Anã e do cv. FHIA 01 (Tabela 3).

Tabela 2. Massa fresca (MF), percentagem de colonização micorrízica (Col), número de galhas e número de ovos de nematóides no sistema radicular das plantas Prata-Anã e FHIA 01 inoculadas com *Glomus clarum* (Gc) e, ou *Meloidogyne incognita* (Mi), após 60 dias em casa de vegetação.

Característica	Sistema radicular					
	Gc+Mi		Gc		Mi	
	Prata-Anã	FHIA 01	Prata-Anã	FHIA 01	Prata-Anã	FHIA 01
MF (g)	43,25 aA	45,47 aA	45,18 aA	45,87 aA	42,23 aA	41,52 aA
Col (%)	63 aA	59 aA	65 aA	63 aA	0	0
Galhas (n°)	421 aB	468 aB	0	0	854 aA	705 aA
Ovos (n°)	111.116 aB	138.576 aB	0	0	237.423 aA	195.784 aA

Para cada característica avaliada, dentro do mesmo tratamento, médias seguidas da mesma letra minúscula, na linha ou mesma letra maiúscula, na linha dentro da mesma cultivar, não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5 % de probabilidade. A análises do número de ovos foram feitas com os dados transformados em logaritmo de base 10.

Tabela 3. Massa fresca (MF) e Massa seca (MS) da parte aérea das cultivares Prata-Anã e FHIA 01 inoculadas com *Glomus clarum* (Gc) e, ou *Meloidogyne incognita* (Mi), após 60 dias em casa de vegetação.

Características	Parte aérea					
	Gc+Mi		Gc		Mi	
	Prata-Anã	FHIA 01	Prata-Anã	FHIA 01	Prata-Anã	FHIA 01
MF (g)	24,15aA	23,37aA	25,26aA	26,74aA	19,11bB	21,37bB
MS (g)	0,93aA	0,86aA	1,01aA	0,98aA	0,64aA	0,67aA

- Para cada parâmetro avaliado, dentro do mesmo tratamento, médias seguidas da mesma letra minúscula, na linha, ou dentro da mesma cultivar, médias seguidas da mesma letra maiúscula, na linha não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5 % de probabilidade.

3.2. Sistema de compartimentalização de raízes de bananeira micropropagada inoculada com *Glomus clarum* e ou *Meloidogyne incognita*

O sistema de compartimentalização permitiu a divisão do sistema radicular, apresentando associações micorrízicas e não micorrízicas, quando inoculados ou não com o FMA. O nível de colonização variou entre 63 a 80 % no cv. Prata-Anã e de 67 a 71 % para o cv FHIA 01 (Figura 2; Tabelas 4 e 5). Não houve contaminação do compartimento não inoculado por FMA. O nível de colonização não foi afetado pela presença do nematóide (Tabelas 4 e 5).

Plantas de ambos os cultivares inoculadas com *G. clarum* destacaram-se por apresentarem as maiores alturas (Tabelas 4 e 5). As menores alturas foram observadas nas plantas controle e nas inoculadas somente com *M. incognita*. O mesmo padrão de resposta foi observado para a massa fresca da parte aérea (Tabelas 4 e 5). A massa fresca do sistema radicular dos dois compartimentos (C-1 e C-2), quando comparadas entre si, não diferiu estatisticamente entre os tratamentos, entretanto, a biomassa total da planta foi maior nas plantas inoculadas com *G. clarum*, mesmo que tivessem sido também inoculadas com *M. incognita* no mesmo local (Tabelas 4 e 5).

Para o cv. Prata-anã não houve diferenças no número de galhas entre os tratamentos que receberam o nematóide, entretanto, o número de ovos foi reduzido no compartimento que recebeu o FMA e o nematóide quando comparado com os tratamentos que foram aplicados só o nematóide ou o FMA e o nematóide em compartimentos separados (Tabela 4). No cv. FHIA 01 o compartimento que foi aplicado o FMA e o nematóide juntos teve o número de galhas e o de ovos reduzidos quando comparados com os outros tratamentos (Tabela 5).

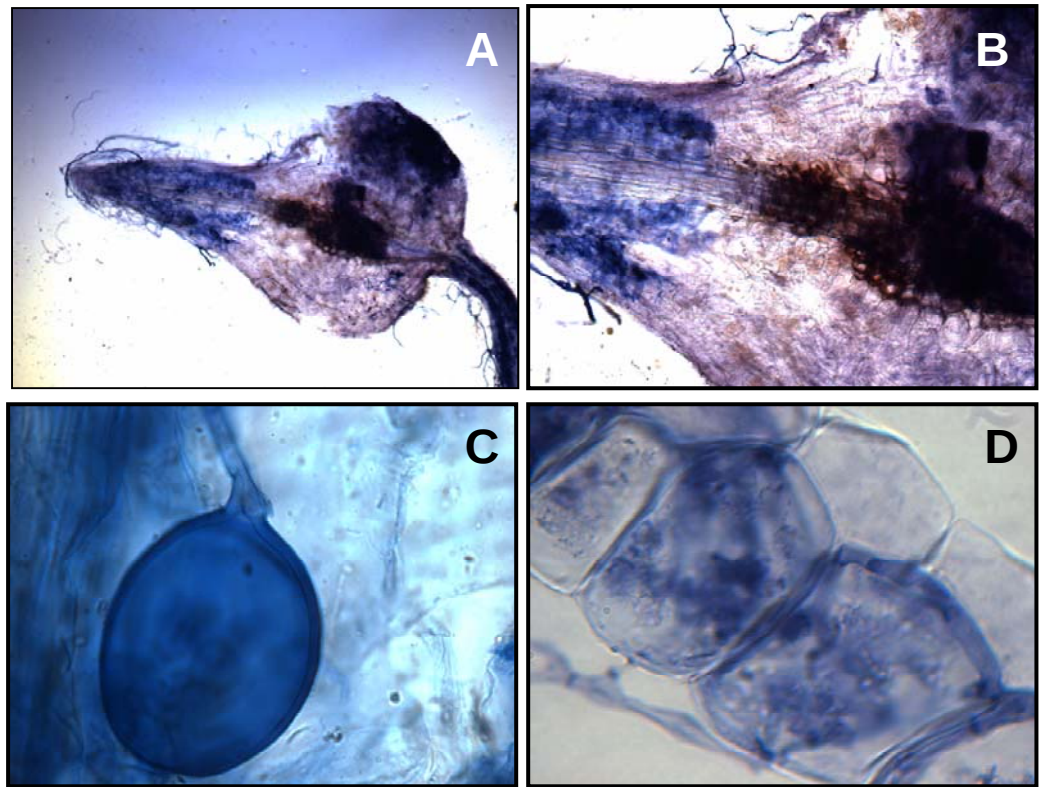


Figura 2: Formação de galhas de *Meloidogyne incognita* e de estruturas do fungo *Glomus clarum*, em associação, parasítica e simbiótica, respectivamente, em raízes de bananeira em casa de vegetação, após 50 dias em sistema de compartimentalização de raízes. (A) Fragmento de raiz corada com azul de tripano, contendo galha e evidenciando a presença de arbúsculos na região limite da galha. (B) Detalhe de galha e arbúsculos na região da raiz. (C) Vesícula no interior da raiz. (D) Arbúsculos e hifas.

As plantas do cv. FHIA 01 apresentaram maior altura e massa fresca da parte aérea quando inoculadas somente com *G. clarum* (Tabela 5). Plantas que não foram inoculadas com *G. clarum* e foram infestadas com *M. incognita*, apresentaram altura reduzida igual à planta controle, sem inoculação (Tabela 5). Os diferentes tratamentos não afetaram a massa fresca do sistema radicular dos dois recipientes (Tabela 5). Foi observado incremento na biomassa do cv. FHIA 01 nas plantas inoculadas somente com *G. clarum* e nas plantas inoculadas com *G. clarum* e *M. incognita* no mesmo local (Tabela 5).

A atividade da PO no sistema radicular tanto da Prata-Anã e FHIA 01 não difeririam entre os tratamentos.

Tabela 4. Altura (cm) e massa fresca (g) da parte aérea, massa fresca (g) dos compartimentos 1 (C-1) e 2 (C-2) da unidade experimental, biomassa total da planta, colonização micorrízica (Col), número de galhas e número de ovos de nematóides do sistema radicular de plantas de bananeira cultivar Prata-Anã, inoculados com *Glomus clarum* (+Gc) ou não (-Gc) e infestados com *Meloidogyne incognita* (+Mi) ou não (-Mi), em casa de vegetação durante 60 dias no sistema de compartimentalização de raiz.

			Parte aérea		Massa fresca (g) sistema radicular		Sistema radicular			
Unidade experimental		Altura (cm)	Massa fresca (g)	Unidade experimental		Biomassa total da planta (g)	Col (%)	Galhas (n)	Ovos (n)	
C-1	C-2			C-1	C-2					
T1	+Gc -Mi	-Gc -Mi	32,3 a	38,0 a	33,52 aA	29,13 aA	100,6 a	80 a	0	0
T2	-Gc +Mi	-Gc -Mi	23,2 c	26,4 c	22,16 cA	23,71 cA	72,2 c	0	624 a	249.175 a
T3	+Gc -Mi	-Gc +Mi	25,2 b	28,7 b	29,37 bA	25,94 bA	84,8 b	63 a	544 a	121.549 a
T4	+Gc +Mi	-Gc -Mi	28,3 b	33,2 b	29,32 bA	27,19 abA	89,7 ab	73 a	423 a	78.271 b
T5	-Gc -Mi	-Gc -Mi	23,6 c	26,3 c	24,56 bA	26,87 bA	77,7 c	0	0	0

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, ou mesma letra maiúscula na linha, dentro da unidade experimental, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Tabela 5. Altura (cm) e massa fresca (g) da parte aérea, massa fresca (g) dos compartimentos 1 (C-1) e 2 (C-2) da unidade experimental, biomassa total da planta, colonização micorrízica (Col), número de galhas e número de ovos de nematóides do sistema radicular de plantas de bananeira cultivar FHIA 01, inoculados com *Glomus clarum* (+Gc) ou não (-Gc) e infestados com *Meloidogyne incognita* (+Mi) ou não (-Mi), em casa de vegetação após 60 dias no sistema de compartimentalização de raiz.

		Parte aérea		Massa fresca (g) sistema radicular		Sistema radicular				
Unidade experimental		Altura (cm)	Massa fresca (g)	Unidade experimental		Biomassa total da planta (g)	Col (%)	Galhas (n)	Ovos (n)	
C-1	C-2			C-1	C-2					
T1	+Gc -Mi	-Gc -Mi	30,8 a	36,4 a	32,71 aA	28,85 aA	97,96 a	68 a	0	0
T2	-Gc +Mi	-Gc -Mi	24,5 c	27,1 b	26,32, bA	24,01 bA	77,43 b	0	563 a	261.472 a
T3	+Gc -Mi	-Gc +Mi	26,3 b	25,5 bc	25,47 bA	27,38 aA	78,35 b	71 a	504 a	106.452 a
T4	+Gc +Mi	-Gc -Mi	26,9 b	28,3 b	28,69 abA	26,94 bA	88,93 ab	67 a	297 b	85.274 b
T5	-Gc -Mi	-Gc -Mi	24,7 c	25,8 bc	26,32 bA	27,75 aA	79,87 b	0	0	0

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, ou mesma letra maiúscula na linha, dentro da unidade experimental, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

3.3 Análises enzimáticas em sistema de compartimentalização de raízes de bananeira micropropagada inoculada com *Glomus clarum* e *Meloidogyne incognita*

A atividade de PO no cv. Prata-Anã e FHIA 01 não diferiu entre os tratamentos entre os dias avaliados após a infestação (Tabelas 6 e 7).

Houve diferença estatística na atividade de PAL entre os tratamentos e os dias avaliados após a aplicação dos nematóides para o cv. Prata-Anã e FHIA 01 (Tabelas 8 e 9). A atividade de PAL nas raízes de Prata-Anã antes (0 dia) da infestação com os ovos não diferiram entre os tratamentos, entretanto, 4 dias após a infestação essa atividade foi maior nas raízes que permaneceram na metade do compartimento que recebeu só *M. incognita* e *M. incognita* e *G. clarum* (Tabela 8). Este aumento da atividade foi observado também para as raízes 7 dias após a infestação (Tabela 8).

O cv. FHIA 01 apresentou maiores atividades de PAL 4 dias após a aplicação do nematóide no mesmo compartimento do FMA e, também, nas raízes que receberam somente o nematóide (Tabela 9).

Tabela 6. Atividade de peroxidase, $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína, no sistema radicular de bananeira cultivar Prata-Anã, dos compartimentos 1 (C-1) e 2 (C-2) da unidade experimental, inoculadas (+GC) ou não (-CG) com *Glomus clarum* e 0, 4 e 7 dias após a infestação (+Mi) ou não (-Mi) com *Meloidogyne incognita* e colonização micorrízica (Col) (%) aos 0 e 7 dias após a infestação de *M. incognita*, em casa de vegetação, no sistema de compartimentalizado de raiz.

		Dias após infestação com ovos de <i>M. incognita</i>							Col (%)	
		0		4		7		Dias		
		C-1	C-2	C-1	C-2	C-1	C-2	0	7	
T1	+Gc -Mi	-Gc -Mi	14,57	13,63	15,11	14,92	15,68	15,37	52	57
T2	-Gc +Mi	-Gc -Mi	16,74	14,59	14,82	15,28	15,16	16,27	0	0
T3	+Gc -Mi	-Gc +Mi	14,25	15,64	15,64	15,37	16,38	15,72	47	52
T4	+Gc +Mi	-Gc -Mi	15,91	14,85	14,73	15,73	16,45	15,94	50	64
T5	-Gc -Mi	-Gc -Mi	13,62	15,37	16,26	15,43	14,52	14,64	0	0

Valores não significativos, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Tabela 7. Atividade de peroxidase, $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína, no sistema radicular de bananeira cultivar FHIA 01, dos compartimentos 1 (C-1) e 2 (C-2) da unidade experimental, inoculadas (+GC) ou não (-CG) com *Glomus clarum* e 0, 4 e 7 dias após a infestação (+Mi) ou não (-Mi) com *Meloidogyne incognita* e colonização micorrízica (Col) (%) aos 0 e 7 dias após a infestação de *M. incognita*, em casa de vegetação, no sistema de compartimentalizado de raiz.

Sistema radicular										
		Dias							Col (%)	
		0		4		7		Dias		
	C-1	C-2	C-1	C-2	C-1	C-2	C-1	C-2	0	7
T1	+Gc -Mi	-Gc -Mi	15,22	15,47	16,37	15,71	16,35	15,63	64	68
T2	-Gc +Mi	-Gc -Mi	14,35	16,33	16,69	16,37	15,41	15,47	0	0
T3	+Gc -Mi	-Gc +Mi	15,83	16,51	15,44	16,24	15,87	16,8	76	74
T4	+Gc +Mi	-Gc -Mi	15,74	15,55	16,35	15,49	16,92	13,27	68	72
T5	-Gc -Mi	-Gc -Mi	16,33	13,64	14,89	15,51	15,75	14,91	0	0

Valores não significativos, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Tabela 8. Atividade de fenilalanina amônia liase, nmol de ácido cinâmico h⁻¹ mg⁻¹ de proteína, no sistema radicular de bananeira cultivar Prata-Anã, dos compartimentos 1 (C-1) e 2 (C-2) da unidade experimental, inoculadas (+GC) ou não (-CG) com *Glomus clarum* e 0, 4 e 7 dias após a infestação (+Mi) ou não (-Mi) com *Meloidogyne incognita* e colonização micorrízica (Col) (%) aos 0 e 7 dias após a infestação de *M. incognita*, em casa de vegetação, no sistema de compartimentalizado de raiz.

Sistema radicular										
Dias									Col (%)	
			0		4		7		Dias	
	C-1	C-2	C-1	C-2	C-1	C-2	C-1	C-2	0	7
T1	+Gc -Mi	-Gc -Mi	89 aA	96 aA	93 aB	103 aB	98 bB	119 aB	52	57
T2	-Gc +Mi	-Gc -Mi	93 aA	91 aA	131 aA	98 bB	151 aA	93 bB	0	0
T3	+Gc -Mi	-Gc +Mi	87 aA	82a A	101 bB	145 aA	123 bB	169 aA	47	52
T4	+Gc +Mi	-Gc -Mi	93 aA	88 aA	125 aA	98 aB	141aA	121aB	50	64
T5	-Gc -Mi	-Gc -Mi	81 aA	83 aA	109 aB	99 aB	111aB	117aB	0	0

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, no mesmo dia, e letras maiúsculas na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Tabela 9. Atividade de fenilalanina amônia liase, nmol de ácido cinâmico h⁻¹ mg⁻¹ de proteína, no sistema radicular de bananeira cultivar FHIA 01,, dos compartimentos 1 (C-1) e 2 (C-2) da unidade experimental, inoculadas (+GC) ou não (-CG) com *Glomus clarum* e 0, 4 e 7 dias após a infestação (+Mi) ou não (-Mi) com *Meloidogyne incognita* e colonização micorrízica (Col) (%) aos 0 e 7 dias após a infestação de *M. incognita*, em casa de vegetação, no sistema de compartimentalizado de raiz.

Sistema radicular										
		Dias							Col (%)	
		0		4		7		Dias		
	C-1	C-2	C-1	C-2	C-1	C-2	C-1	C-2	0	7
T1	+Gc -Mi	-Gc -Mi	75aA	75aA	81a	75a	101Aa	95aA	64	68
T2	-Gc +Mi	-Gc -Mi	76aA	74aA	89aA	81aA	98aA	103aA	0	0
T3	+Gc -Mi	-Gc +Mi	77aA	76aA	79aB	86aA	96aA	99aA	76	74
T4	+Gc +Mi	-Gc -Mi	78aA	75aA	93aA	76bB	102aA	98aA	68	72
T5	-Gc -Mi	-Gc -Mi	74aA	75aA	76aB	78aB	99aA	91aA	0	0

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, e maiúscula na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade

4. DISCUSSÃO

Os nematóides reproduziram-se no sistema radicular da bananeira (Tabela 2) e não afetaram os FMA, uma vez que em nosso trabalho a colonização micorrízica foi estabelecida anteriormente à infestação do nematóide, apresentando abundantes estruturas típicas da associação micorrízica arbuscular (Figura 1). Entretanto os FMAs podem ser afetados negativamente pela presença de nematóides que destroem as células corticais do tecido do hospedeiro. Arbúsculos, vesículas e hifas internas podem ser reduzidas em decorrência da colonização do patógeno e diminuição da suplementação de carboidratos na raiz como resultado da necrose formada pelo nematóide e, conseqüentemente, reduzindo crescimento da planta (Azcón-Aguilar & Barea 1996; Cofcewicz et al., 2001).

Os FMAs e os nematóides são comumente encontrados habitando a rizosfera e colonizando raízes de plantas. Esses dois microrganismos exercem efeitos opostos no crescimento das plantas. Trabalhos tem mostrado interação entre FMAs e nematóides (Pinochet et al., 1996; Tavalera et al., 2002; Elsen et al., 2003; Elsen et al., 2008). As mudanças no sistema radicular causado pelos FMAs torna-o mais eficiente, promovem o crescimento vigoroso da planta diminuindo assim o efeito negativo do patógeno (Siddiqui & Mahmood, 1995). A redução do crescimento de plantas em função do estabelecimento nematóides nas raízes é menor quando colonizadas por fungos micorrízicos (Cofcewicz et al., 2001).

A associação FMAs-nematóides-plantas é bastante específica e alterações em um dos componentes pode levar à diversidade de resultados

(Siddiqui & Mahmood, 1995). Em geral os dados existentes indicam que as reduções de crescimento, consequência da infecção por nematóides, têm sido menores em plantas colonizadas por fungos micorrízicos comparadas às plantas controle (Cofcewicz et al., 2001).

O efeito benéfico de *G. clarum* foi evidenciado em maior crescimento das plantas (Tabelas 2 e 3) e também na redução do número de galhas (Tabela 2), evidenciando o seu efeito contra os nematóides. Diedhiou et al. (2003) e Siddiqui & Mahamood, (2007) verificaram o incremento no crescimento de plantas quando inoculadas com *G. coronatum* e *G. mosseae* e redução da infestação, de galhas e da reprodução de *M. incognita*. Este efeito contra os nematóides tem sido verificado em condições *in vitro*. *Glomus intraradices* e *Radopholus similis* foram capazes de crescer em condições dioxênicas em raízes cenoura transformadas e, através desse sistema, foi observado supressão do FMA de 50 % na população de *R. similis*, e aumento da proteção da raiz contra o nematóide (Elsen et al., 2001). A redução do crescimento de plantas de tomate ocorrida em função do estabelecimento de *M. javanica* nas raízes é menor quando colonizadas por *G. etunicatum* (Cofcewicz et al., 2001).

No presente estudo, a inoculação do FMA reduziu o número de ovos de *M. incognita* e também o número de galhas (Tabela 2). Trabalhos na literatura têm mostrado que plantas colonizadas por FMAs apresentam poucas galhas contendo poucas fêmeas, os nematóides são menores em tamanho e, devido a essa característica, precisam de um tempo maior para se desenvolver até adulto (Diedhiou et al. 2003; Freire et al., 2007). Entretanto, essa maior reprodução pode ser explicada pelo fato de raízes micorrizadas atraírem maior

número de juvenis infectivos, pela maior liberação de exsudados radiculares, determinando uma maior eclosão de ovos (Freire et al., 2007). A colonização micorrízica promove maior desenvolvimento do sistema radicular, resultando em maiores números de sítios de penetração e maior sobrevivência pós-penetração dos juvenis (Cofcewicz et al., 2001; Freire et al., 2007). Fêmeas adultas podem produzir maior número de ovos sobre plantas micorrizadas, geralmente mais vigorosas. Apesar dessas evidências, trabalhos têm relatados efeitos supressivos dos FMAs sobre o número de ovos.

Essa variação nos resultados pode ser devido ao número e tamanho das galhas formadas. Galhas pequenas, formadas por um ou pouco juvenis, a fêmea coloca a massas de ovos fora da raiz, enquanto que galhas maiores, a maioria da massa de ovos pode ser colocada no interior da raiz (Dedhiou et al., 2003). Em nossos estudos os tamanhos das galhas foram muito variados, apresentando essa diversidade de tamanho no mesmo sistema radicular.

Os *J₂ Meloidogyne* spp. ao penetrarem nas raízes, atravessam o parênquima cortical e posicionam no cilindro central, em nível de endoderme/periciclo, estabelecendo o parasitismo. As células alimentadoras e as galhas podem se estender em todo o córtex, local onde os FMAs colonizam as raízes e, conseqüentemente, local de interação entre os organismos (Hol & Cook, 2005).

Além de estudos de FMAs, bactérias, rizobactérias e fungos reduzem os danos e/ou reprodução dos nematóides e melhoram a nutrição do hospedeiro (Freitas et al., 2000; Dedhiou et al., 2003; Siddiqui et al., 2007). O fungo *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* colonizou raízes e promoveu crescimento de plantas de tomate *in vitro* e controlou a reprodução de *M.*

javanica (Giaretta, 2008). *Rhizobium etli* induziu resistência sistêmica ao *M. javanica* no sistema radicular de tomateiro (Fabry, 2006). Esses resultados reafirmam que os microrganismos, entre eles, os FMAs podem ser utilizados no controle biológico de nematóides, e também, no favorecimento do crescimento das plantas.

O aumento nas atividades de PO e PAL pode ser devido à explosão oxidativa, que ocorre após reconhecimento do patógeno, que gera e acumula rapidamente EORs gerando dano oxidativo, ativando respostas de defesa na planta (Alguacil et al., 2003). A resistência a nematóides pode ocorrer pela resposta de hipersensibilidade e ativação de rotas metabólicas envolvidas na biossíntese de fitoalexinas, além de deposição de calose, lignina e acúmulo de compostos fenólicos. Tem sido relatado aumento da atividade da enzima PAL, PO, polifenoloxidase, quitinases. Entre essas enzimas, a peroxidase é uma importante enzima presente em plantas e está envolvida com a oxidação de fenóis, cicatrização de ferimentos, defesa de patógenos, resposta de hipersensibilidade, síntese de lignina e suberina e toxidez direta sobre patógenos. Atua na degradação oxidativa de compostos fenólicos próximo ao local celular provocada por patógenos (Alguacil et al., 2003; Arfaoui et al., 2007).

Células do sistema radicular com arbúsculos não foram infectadas com o patógeno e a sua proliferação foi reduzida em raízes micorrizadas e também em partes do sistema radicular (Figura 1), demonstrando que a bioproteção é diretamente ligada à colonização da raiz por FMA. Estudos citomoleculares mostraram que o efeito protetor sistêmico e localizado induzido por FMA, envolve acúmulo de moléculas de defesa em associação com reação de

elicitção da parede celular do hospedeiro. A modificação da parede celular associada com resistência localizada e formação de papila caracteriza resistência sistêmica a *P. parasitica* em tomateiro micorrizado (Cordier et al., 1998).

O FMA *Glomus mosseae* foi efetivo em reduzir sintoma de doença de *P. parasitica* em tomateiro e a evidência foi a combinação de resistência localizada e sistêmica. Análise de enzimas de defesa mostrou essa combinação de mecanismos pela detecção de isoformas de enzimas em raízes não micorrizadas e também atividade lítica contra parede celular de *P. parasitica* (Pozo et al., 2002). Novas isoformas de quitinases, quitosanases e β -1,3-glucanase foram induzidas localmente nas raízes colonizadas pelo FMA (Pozo et al., 2002).

Os resultados deste trabalho mostram que o efeito protetor dos FMAs aos nematóides pode ser localizado, podendo diretamente relacionado com a formação de estruturas internas e externas do fungo (Figura 1).

Controle biológico pode ser definido como “a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não o homem” (Cook & Baker, 1983). Dessa forma, os FMAs podem ser considerados como agente de controle biológico, entretanto a diversidade de resposta da combinação FMA-nematóide e, também da planta, é única. Generalizações são dificultadas uma vez que a interação é dependente do hospedeiro, da espécie do nematóide, da espécie do FMA e das combinações nematóide e densidade do inóculo inicial do FMA; fertilidade do solo e inóculo do nematóide.

5. CONCLUSÕES

- *G. clarum* afetou a reprodução de *M.incognita*.
- O sistema de compartimentalização permitiu a divisão do sistema radicular e não houve contaminação entre os compartimentos.
- O fungo *G. clarum* promoveu o crescimento das plantas de bananeiras micropropagadas no sistema de compartimentalização.
- *G. clarum* reduziu o número de galhas e de ovos quando inoculado no mesmo compartimento da aplicação de *M.incognita* no sistema de compartimentalização.
- A atividade enzimática da PO não foi afetada pela presença do fungo e ou nematóide e a atividade da PAL aumentou nas raízes com nematóides.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alguacil, M. M.; Hernández, J. A.; Caravaca, F.; Portillo, B.; Roldán, A. Antioxidant enzyme activities in shoots from three mycorrhizal shrub species afforested in a degraded semi-arid soil. **Physiologia Plantarum**, 118: 562-570, 2003.
- Arfaoui, A.; Hadrami, A. E.; Mabrouk, Y.; Sifi, B.; Boudabous, A.; Hadrami, I. E.; Daayf, F.; Chérif, M. Treatment of chickpea with *Rhizobium* isolates enhances the expression of phenylpropanoid defense-related genes in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. **Plant Physiology and Biochemistry**, 45:470-479, 2007.
- Azcón-Aguilar, C. & Barea, J. M. Arbuscular micorrizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved. **Mycorrhiza**. 6: 457-464, 1996.
- Barea, J. M.; Pozo, M. J.; Azcón, R.; Azcón-Aguilar, C. Microbial co-operation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, 56:1761-1778, 2005.
- Bécard, G. & Fortin, A. Early events of vesicular arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. **New Phytologist**, 108:211-218, 1988.
- Bonetil, J.I.S. & S. Ferraz. Modificação do método de Hussey & Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, 6:533, 1981.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248-254, 1976.
- Brundrett, M.; Bougher, N.; Dell, B.; Grove, T.; Malajczuk, N. **Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture**. ACIAR Monograph, 374p. 1996.
- Clark, R. B. Characterization of phosphatases of intact maize roots. **Journal Agriculture Food and Chemistry**, 23: 458-460, 1975.
- Cofcewicz, E. T.; Medeiros, C. A. B.; Carneiro, R. M. D. G.; Pierobom, C. R. Interação dos fungos micorrízicos arbusculares *Glomus etunicatum* e

- Gigaspora margarita* e o nematóide das galhas *Meloidogyne javanica* em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, 26:65-70, 2001.
- Cook, R. J. & Baker, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St Paul. The American Phytopathological Society. 539p. 1983.
- Cordier, C.; Pozo, M. J.; Barea, J. M.; Gianinazzi, S.; Gianinazzi-Pearson V.; Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 11:1017-1028, 1998.
- Costa, F. A. **Micorrizas arbusculares e enzimas do estresse oxidativo em raízes de cenoura transformada e em morangueiro**. Viçosa: UFV, 2003. 92 p. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2003.
- del Río, L. A.; Sandalio, L. M.; Corpas, F. J.; Palma, J. M.; BarEOn, J. B. Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in Peroxisomes. Production, Scavenging, and Role in Cell Signaling. **Plant Physiology**, 141:330-335, 2006.
- Diedhiou, P. M.; Hallmann, J.; Oerke, E. C.; Dehne, H. W. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and a non-pathogenic *Fusarium oxysporum* on *Meloidogyne incognita* infestation of tomato. **Mycorrhiza**, 13:199-204, 2003.
- Elsen, A.; Beeterens, R.; Swennen, R.; De Waele, D. Effects of an arbuscular mycorrhizal fungus and two plant-parasitic nematodes on *Musa* genotypes differing in root morphology. **Biology and Fertility of Soils**, 38:367–376, 2003.
- Elsen, A.; Declerck, S.; De Waele, D. Effects of *Glomus intraradices* on the reproduction of the burrowing nematode (*Radopholus similis*) in dioxenic culture. **Mycorrhiza**, 11:49-51, 2001.
- Elsen, A.; Gervasio, D.; Swennen, R.; De Waele, D. AMF-induced biocontrol against plant parasitic nematodes in *Musa* sp.: a systemic effect. **Mycorrhiza**, 18:251-256, 2008.
- Fabry, C. F. **Indução de resistência ao nematóide das galhas (*Meloidogyne* spp.) em tomateiro por rizobactérias**. Viçosa:UFV, 2006. 73 p.

- Dissertação (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 2006.
- Freire, E. S.; Campos, V. P.; Dutra, M. R.; Rocha, F. S.; Silva, J. R. C.; Pozza, E. A. Infectividade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita* em tomateiro após privação alimentar em solo e água em diferentes condições. **Summa Phytopathologica**, 33:270-274, 2007.
- Garcia-Garrido, J. M. & Ocampo, J. A. Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Journal of Experimental Botany**, **53**: 1377–1386, 2002.
- Gianinnazzi-Pearson, V. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting the roots of symbiosis. **The Plant Cell**, 8:1871-1883, 1996.
- Giaretta, R. D. **Isolamento, identificação e avaliação de *Pochonia chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne javanica* e na produção de crescimento de tomateiro**. Viçosa: UFV, 2008. 97 p. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 2008.
- Hol, W.H. G. & Cook, R. An overview of arbuscular mycorrhizal fungi–nematode interactions. **Basic and Applied Ecology**, 6:489-503, 2005.
- Kuzniak, E. & Urbanek, H. The involvement of hydrogen peroxide in plant responses to stresses. **Acta Physiologiae Plantarum**, 22: 195-203, 2000.
- Lambais, M. R.; Ríos-Ruiz, W. F.; Andrade, R. M. Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, 160:421-428, 2003.
- Linderman, R. G. Role of VAM fungi in biocontrol. In: PFLEGER, F. L.; LINDERMAN, R. G. (Ed.). **Mycorrhiza and plant health**. St. Paul : APS, . p. 1-24, 1994.
- Matamoros, M. A.; Dalton, D. A.; Ramos, J.; Clemente, M. R.; Rubio, M. C.; Bacana, M. Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis. **Plant Physiology**, 133:499-509, 2006.
- Menolli, L. N.; Finger, F. L.; Puiatti, M.; Barbosa, J. M.; Barros, R. S. Atuação das enzimas oxidativas no escurecimento causado pela injúria por frio em raízes de batata batata-baroa. **Acta Science Agronomie**, 30:57-63, 2008.
- Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, 7:405-410, 2002.

- Murashige, T. & Skoog, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15:473-497, 1962.
- Phillips, J. M. & Hayman, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transaction of the British Mycological Society**, 55:158-161, 1970.
- Pinochet, J. C.; Calvet, A.; Camprubi, C.; Fernandez. Interactions between migratory endoparasitic nematodes and arbuscular mycorrhizal fungi in perennial crops: a review. **Plant and Soil**, 185:183-190, 1996.
- Pozo, M. J.; Cordier, C.; Dumas-Gaudot, E.; Gianinazzi, S.; Barea, J., M.; Azcón-Aguilar, C. Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defense responses *Phytophthora* infection in tomato plants. **Journal of Experimental Botany**, 53(368):525-534, 2002.
- Ritzinger, C. H. S. P. & Fancelli, M. Manejo integrado de nematóides na cultura da bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 28: 331-338, 2006.
- Ritzinger, C. H. S. P.; Borges, A. L.; Ledo, C. A. S.; Caldas, R. C. Fitonematóides associados a bananais 'pacovan' sob condição de cultivo irrigado: relação com a produção. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 29:677-680, 2007.
- Selosse, M. A.; Baudoin, E.; Vandenkoornhuyse, P. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. **Comptes Rendus Biologies**, 327: 639–648, 2004.
- Siddiqui, Z. A. & Mahmood, I. Role of plant symbionts in nematode management: A review. **Bioresource Technology**, 54: 217-226, 1995.
- Siddiqui, Z. A.; Baghel, E.G.; Akhtar, M. S. Biocontrol of *Meloidogyne javanica* by *Rhizobium* and plant growth-promoting rhizobacteria on lentil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 23:435–441, 2007.
- Souza, D. S. **Micropropagação das bananeiras Prata-Anã e FHIA 01 a partir de explantes provenientes de plantas tratadas com paclobutrazol**. Viçosa: UFV, 2007. 45 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2007.
- Talavera, M.; Itou, K.; Mizukubo, T. Combined application of *Glomus* sp. and *Pasteuria penetrans* for reducing *Meloidogyne incognita* (Tylenchida:

Meloidogynidae) populations and improving tomato growth. **Applied Entomology and Zoology**, 37:61–67, 2002.

Wuyts, N.; Waele, D.; Swennen, R. Activity of phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenol oxidase in roots of banana (*Musa acuminata* AAA, cvs Grande Naine and Yangambi Km5) before and after infection with *Radopholus similis*. **Nematology**, 8:201-209, 2006.

CONCLUSÕES GERAIS

- A cultura monoxênica de *M. incognita* em raízes de cenoura transformadas é útil para estudos *in vitro* e, também para manutenção de cultura pura.
- Em cultura dixênica, *G. clarum* afetou a reprodução de *M. incognita*.
- O sistema de cultivo tripartite permite a micorrização *in vitro* de bananeira micropropagada, evidenciando o efeito benéfico da simbiose na fase de aclimatização, no crescimento, e no desenvolvimento das plantas.
- O sistema de compartimentalização de raízes de bananeira micropropagada evidenciou que a resistência do *G. calrum* sobre o *M. incognita* é localizada.
- As atividades de peroxidase e fenilalanina amônia liase são maiores em raízes associadas ao FMA na presença de *M. incognita*.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)