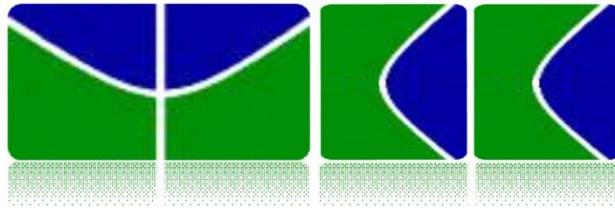


Trabalho de Conclusão de Curso
Licenciatura em Ciências Naturais



**FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM
LAVOURAS DE SOJA E ALGODÃO COM
OCORRÊNCIA DE NEMATÓIDES DO GÊNERO
Pratylenchus EM CONDIÇÕES DE CERRADO**

Carlos Guilherme Ribeiro de Alencar

Orientadoras:

Prof^ª Dr^ª Dulce Maria Sucena da Rocha

Dr^ª Cynthia Torres de Toledo Machado

Universidade de Brasília
Faculdade UnB Planaltina

Fevereiro/2013

Fungos micorrízicos arbusculares em lavouras de soja e algodão com ocorrência de nematóides do gênero *Pratylenchus* em condições de cerrado

Carlos Guilherme Ribeiro de Alencar ^a

**Orientadoras: Prof. Dr^a. Dulce Maria Sucena da Rocha ^b
Dr^a Cynthia Torres de Toledo Machado ^c**

RESUMO

As micorrizas arbusculares são associações simbióticas entre fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e raízes, de ocorrência bastante ampla, tanto em espécies vegetais colonizadas como em distribuição geográfica. Os principais benefícios dessa simbiose para as plantas estão relacionados ao aspecto nutricional, mas a associação micorrízica também reduz danos por estresses bióticos. (MIRANDA, 2008). Para os nematóides especificamente, a interação com os FMAs pode resultar no aumento, redução ou nenhum efeito sobre o ataque. Existem evidências de maior resistência de plantas micorrizadas e redução na reprodução dos nematóides em várias culturas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). Estudos sobre a interação de *Pratylenchus* e FMAs em espécies agrícolas importantes para o Cerrado praticamente inexistem. Portanto, a caracterização das populações de FMAs em áreas de ocorrência de danos por *Pratylenchus* podem reverter em práticas de controle do patógeno. O objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência de fungos micorrízicos nas fazendas Assahi, Triunfo e Xanxerê, localizadas no oeste baiano, a partir de levantamentos quantitativos das populações, comparando áreas de cultivo de algodão e soja danificadas ou não por *Pratylenchus* e, em cultura de soja nas fazendas Dacar (Vera, MT) e Sementes Primavera (Planaltina, DF), em pontos dentro, fora e intermediários às reboleiras.

Palavras-chave: Fungos micorrízicos arbusculares, Nematóides, *Pratylenchus*, Cerrado

^a Graduando em Ciências Naturais - Universidade de Brasília – Campus Planaltina – Área Universitária n.º 1 Vila Nossa Senhora de Fátima - CEP 73300-000, Planaltina, DF – Brasil. cgralencar@gmail.com

^b Professora da Universidade de Brasília – Campus Planaltina – Área Universitária n.º 1 Vila Nossa Senhora de Fátima - CEP 73300-000, Planaltina, DF. dmsrocha@unb.br

^c Pesquisadora da Embrapa Cerrados - BR 020 Km 18 - CEP 73310-970, Planaltina, DF – Brasil. cynthia.torres@embrapa.br

1. INTRODUÇÃO

As micorrizas englobam várias associações simbióticas entre fungos e raízes, dentre as quais, as micorrizas arbusculares, de ocorrência mais ampla que as demais, tanto em espécies vegetais colonizadas como em distribuição geográfica. Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) ou endomicorrízicos pertencem à ordem Glomales, são asseptados e colonizam as raízes de plantas de quase todos os gêneros das gimnospermas e angiospermas, além de algumas briófitas e pteridófitas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

Os principais benefícios dessa simbiose para as plantas estão relacionados ao aspecto nutricional, uma vez que as hifas fúngicas atuam como uma extensão de sistema radicular, promovendo incrementos na absorção de nutrientes de menor mobilidade, notadamente o fósforo (P). A melhoria no estado nutricional das plantas resulta em outros benefícios diretos ou indiretos e dentre os efeitos não nutricionais são descritos a amenização de estresses abióticos diversos como a seca (SYLVIA e WILLIAMS, 1992), tolerância à acidez e metais pesados (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

A redução de danos por estresses bióticos também é benefício decorrente da associação micorrízica e, para os nematóides especificamente, a interação com os FMAs pode resultar em aumento, redução ou nenhum efeito sobre o ataque, mas existem evidências de maior resistência de plantas micorrizadas e redução na reprodução dos nematóides em várias culturas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). Ainda segundo esses autores, os efeitos dos FMAs sobre os nematóides dependerão de qual organismo se estabelecer primeiro nas raízes e do grau desse estabelecimento, sendo que o que estabelece primeiro obtém vantagem na competição.

De acordo com Goulart (2008):

Os nematóides-das-lesões-radiculares ("root-lesion nematodes") pertencem ao gênero *Pratylenchus*, mundialmente reconhecido como um dos maiores problemas em culturas de grande importância econômica, como, por exemplo, soja, milho, algodão, café, cana-de-açúcar, além de diversas forrageiras, hortaliças e frutíferas. Considerando os impactos econômicos mundiais para diferentes culturas agrícolas, o gênero ocupa o segundo lugar entre todos os nematóides parasitas de plantas. Atualmente, existem 70 espécies do gênero *Pratylenchus* distribuídas em todo o mundo, parasitando dezenas de espécies vegetais. No Brasil, as mais importantes são *P. brachyurus* Filipjev & Schuurmans Stekhoven, *P. zae* Graham e *P. coffeae* Filipjev & Schuurmans Stekhoven, considerando as perdas econômicas e os danos causados, a distribuição geográfica e o número de plantas hospedeiras.

Ainda segundo Goulart (2008, *apud* FERRAZ, 1999):

No Brasil, as culturas mais atacadas por essas espécies são:

- *P. brachyurus*: soja, algodão, milho, feijão, pastagens, sorgo, amendoim, batata, fumo, eucalipto, seringueira, guandu, arroz, abacaxi, algumas hortaliças, cana-de-açúcar, café.
- *P. zae*: cana-de-açúcar, milho, pastagens, sorgo, arroz, trigo.
- *P. coffeae*: café, banana, inhame, graviola, batata.

O gênero *Pratylenchus* congrega nematóides polívoros que podem

parasitar um elevado número de espécies vegetais, porém existem claras diferenças de preferências de hospedeiros entre as espécies do gênero.

Os danos nas plantas hospedeiras são resultantes das seguintes ações: espoliadora (alimentação e consumo do conteúdo de células vegetais), mecânica, tóxica (enzimas e toxinas). Os nematóides-das-lesões-radiculares permanecem migradores durante todo o ciclo de vida e movimentam-se ativamente no solo, até atingir o sistema radicular da planta hospedeira, quando, então, penetram e passam a migrar no córtex radicular, podendo, inclusive, retornar ao solo.

No caso da interação dos FMAs com nematóides do gênero *Pratylenchus*, estudos têm mostrado que fungos do gênero *Glomus* aumentaram a tolerância de feijão (ELLIOT et al., 1984) e cenoura (TALAVERA et al., 2001) ao ataque de *P. penetrans*; de banana (JAIZME-VEJA e PINOCHET, 1997) e café a *P. coffeae* (VAAST et al., 1998) e milho a *P. zae* (JOTHI e SUNDARABABU, 1997), entre outras.

Efeitos deletérios dos nematóides na colonização micorrízica das plantas, bem como na produção de estruturas fúngicas como os esporos (estruturas de reprodução, armazenamento e resistência), as vesículas (que são órgãos de reserva) e os arbúsculos (que são ramificações das hifas que promovem as trocas de nutrientes e metabólitos), também são descritos na literatura. Camprubí et al. (1993) verificaram decréscimo na colonização de raízes de ameixa por *Glomus mosseae* em decorrência do ataque de *P. vulnus*, que também afetou a colonização por *Glomus intraradices* e a formação de vesículas em plantas de marmelo (CALVET et al., 1995). Smith (1988) e Wallace (1987), respectivamente, já especulavam que tais consequências parecem ser decorrentes da redução do espaço físico para a colonização e de uma diminuição no fornecimento de carboidratos nas raízes como resultado da alimentação e migração dos nematóides e da formação das lesões.

Os benefícios dos FMAs contra o ataque de *Pratylenchus* provavelmente são decorrentes de vários eventos associados, como a melhoria do estado nutricional das plantas, competição por sítios de penetração e nutrição, alterações morfológicas nas raízes e microbianas na rizosfera, além da ativação de mecanismos de defesa (AZCÓN-AGUILLAR et al., 2002).

A inoculação de plantas de café por *Glomus clarum* aumentou a tolerância a *P. coffeae* (VAAST et al., 1998), como já comentado anteriormente, mas este efeito não foi associado a um decréscimo na densidade de nematóides nas raízes, ao contrário do observado para banana colonizada por *Glomus mosseae* (ELSEN et al., 2003) e cenoura por *Glomus* sp. (TALAVERA et al., 2001). Não houve um padrão definido nos mais diferentes estudos.

Estudos sobre a interação de *Pratylenchus* e FMAs em espécies agrícolas importantes para o Cerrado praticamente inexistem. Portanto, a caracterização dessas populações de FMAs em áreas de ocorrência de danos por *Pratylenchus* e a elucidação do comportamento dessa interação podem reverter em práticas de controle desse patógeno pela promoção de incremento dos fungos por alternativas de manejo das áreas.

Num primeiro momento nesses estudos é determinada a ocorrência dos FMAs nas áreas. A quantificação da ocorrência dos FMAs nos solos e nas plantas pode ser

realizada por meio de diferentes métodos, como a extração e contagem de esporos no solo, avaliação da colonização radicular e determinação da densidade e infectividade dos propágulos dos fungos pela técnica do número mais provável (NMP), entre outras. No presente trabalho, a ocorrência dos fungos micorrízicos arbusculares foi determinada pela contagem do número de esporos, pela estimativa do potencial de inóculo e pela quantificação da glomalina.

Os esporos são estruturas de reprodução destes fungos e constituem o principal tipo de inóculo. Entretanto, muitas vezes, a densidade deles não se relaciona com a formação micorrízica nos solos, devido à influência de vários outros fatores, inclusive da planta hospedeira e de fatores edafoclimáticos (BRUNDRETT, 1991 *apud* FERNANDES, 2011).

A abundância de esporos no solo é o único indicativo da associação micorrízica, e a ausência dos esporos também não indica, necessariamente, a ausência do fungo, pois há um espaço de tempo entre a associação micorrízica e a esporulação. Por esse motivo, não há como identificar com precisão algumas espécies de fungos a partir do esporo coletado no campo, mas fornecem um indicativo da população presente no solo (BENEDETTI et al., 2005 *apud* FERNANDES, 2011).

O método original foi proposto por Gerdemann e Nicolson (1963) e hoje é praticado com algumas adaptações. Este método é utilizado para quantificar e qualificar os fungos taxonomicamente onde características morfológicas são determinadas, contudo, neste trabalho, foi utilizado somente para a quantificação dos mesmos.

São propágulos de FMAs, além dos esporos, as hifas, o micélio extra-radicular e fragmentos de raízes colonizadas (PORTER, 1979 *apud* FERNANDES, 2011). Assim, para complementar a quantificação dos fungos pela contagem de esporos, é necessário a determinação do potencial de inóculo destes.

A determinação da estimativa do potencial de inóculo, que vem a ser a estimativa de todos os propágulos viáveis, responsáveis pela infecção inicial nos sistemas radiculares das plantas hospedeiras é outro parâmetro utilizado para avaliar a qualidade do inóculo (LIU e LUO, 1994). É determinado por meio de bioensaios conduzidos em casa de vegetação (MOORMAN e REEVES, 1979), onde amostras de solo rizosférico dos locais a serem estudados são depositadas em pequenos vasos (tubetes), utilizando-se uma planta-teste micotrófica. Entre a sexta e a oitava semana, as raízes das plantas são coletadas e a porcentagem média de infecção radicular é quantificada (SIEVERDING, 1991).

Uma glicoproteína insolúvel denominada glomalina é produzida pelas hifas de todos os FMAs, mas não por outros fungos do solo (WRIGHT et al., 1996). A Glomalina atua efetivamente na cimentação das partículas do solo (WRIGHT e UPADHYAYA, 1996) melhorando a estabilidade dos agregados, já estabelecida pelo efeito físico das redes de hifas fúngicas extrarradiculares que interligam e envolvem as partículas do solo. A ocorrência dessa proteína constitui, portanto, uma determinação indireta da ocorrência dos FMAs.

Uma das formas de estimar o teor desta proteína é a extração da glomalina facilmente extraível, atualmente denominada proteína facilmente extraível reativa pelo método de Bradford (EE-BRSP), segundo Rilling (2004). Para este trabalho foi

utilizado o reagente de Bradford para avaliar o teor de EE-BRSP. Como o método de Bradford não é específico para uma única proteína, é necessário cautela com as conclusões e comparações devido a extração simultânea de outras substâncias orgânicas juntamente com a glomalina, já que estas interferem no método de Bradford (PURIN e FILHO, 2010).

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), a partir de levantamentos quantitativos das populações por meio dos métodos citados, em sistemas de produção comerciais de soja e algodão no Distrito Federal, oeste do estado da Bahia e no Mato Grosso, comparando áreas de ocorrência e ausência de danos por *Pratylenchus* situadas sob as mesmas condições edafo-climáticas, no ano agrícola de 2010/2011.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Áreas de estudo e amostragem

Para o presente trabalho, foram escolhidas três áreas de estudo em sistemas de produção comercial de soja e/ou algodão no Distrito Federal (Fazenda Sementes Primavera, em Planaltina), oeste do estado da Bahia (Fazendas Assahi, Triunfo e Xanxerê, nos municípios de São Desidério, Formosa do Rio Preto e Correntina, respectivamente) e no Mato Grosso (Fazenda Dacar, no município de Vera), no ano agrícola de 2010/2011.

2.1.1 Distrito Federal (DF)

As amostragens foram realizadas na Fazenda Sementes Primavera (RIEDE - Região Integrada de Desenvolvimento do Distrito Federal e Entorno), localizada próximo a Planaltina, DF (15°38'16" S, 47°26'52" O). A área, originalmente sob vegetação de Cerrado, foi desmatada durante a década de 1970, implantando pastagem (*Andropogon gayanus*) até 1988, quando iniciou o cultivo com culturas anuais em sistema convencional (grade pesada). Para a safra de 1995/96, iniciou-se o sistema de semeadura direta envolvendo soja e milho (três anos soja, um ano milho), com produtividades médias do talhão, durante os últimos 10 anos, de 7620 kg/ha para milho e 3045 kg/ha para soja. A área possui declividade média de 5% e é composta por Latossolo com textura variando de média a muito argilosa (SÁ et al., 2008).

Por ocasião da amostragem para o presente trabalho, a área estava plantada com soja, em um talhão de textura média¹, onde não se observava sintomas de ataque de nematóides², apesar do histórico de ocorrência do patógeno.

¹ Comunicação pessoal de Marcos A. Carolino de Sá, pesquisador da Embrapa Cerrados, em 2013.

² Informação cedida pelo produtor.

As amostras foram coletadas em talhões com histórico de nematóides (denominados “dentro da reboleira”) e sem histórico de nematóides (chamados “fora da reboleira”). A amostragem foi feita na camada de 0-20 cm, coletando 10 subamostras, sendo 5 no talhão com o histórico de nematóides (“dentro da reboleira”) e 5 no talhão sem histórico de nematóides (“fora da reboleira”).

2.1.2 Mato Grosso (MT)

A Fazenda Dacar está localizada no município de Vera, no estado do Mato Grosso (12°08'25" S e 55°11'42" O), em área originalmente sob vegetação natural típica da região (vegetação em transição entre cerrado e floresta). O solo é um Latossolo Vermelho Amarelo distrófico, textura arenosa (130, 20 e 850 g/kg de argila, silte e areia, respectivamente). A área foi aberta em 2004, sendo cultivada com arroz nos dois primeiros anos e com a sucessão soja/milho desde então. A soja tem recebido a aplicação média de 80 kg/ha de P₂O₅ e K₂O. Em torno de 40% do fertilizante tem sido aplicado no sulco de semeadura e o restante a lanço, sendo o P em pré-semeadura e o K em pós-semeadura. A última calagem foi realizada em abril de 2010, utilizando calcário dolomítico (10% de MgO e 18% de CaO). O calcário foi aplicado em superfície, em dose equivalente a 600 kg. ha⁻¹ (MENDES et. al., 2012).

Para o presente estudo, a amostragem foi realizada em talhão totalmente infestado (em maior ou menor grau) com *Pratylenchus brachyurus*. O talhão apresenta uma pequena declividade e há um gradiente de teor de argila. Na parte mais alta do talhão (denominada “fora da reboleira”), o solo é mais argiloso, sendo que o teor de argila decresce em direção à parte mais baixa do terreno (denominada “dentro da reboleira”). A severidade dos sintomas ocasionados por *P. brachyurus* diminui da parte mais baixa (mais arenosa) em direção à parte mais alta (mais argilosa)³.

No ano de 2010/11, as amostras de solo foram coletadas em duas regiões (Figura 1):

- Região 1 (reboleira): parte mais baixa da área, mais arenosa, e com sintomas mais severos.

- Região 3 (fora da reboleira): corresponde à parte mais alta do talhão, caracterizada por um solo mais argiloso comparativamente às regiões 1 e 2. A região 3, não apresentava sintomas visíveis de ataque por *P. brachyurus* na parte aérea, porém, algumas raízes estavam escurecidas, indicando a presença do patógeno.

³ Comunicação pessoal de Henrique Debiasi, pesquisador da Embrapa Soja, em 2012.

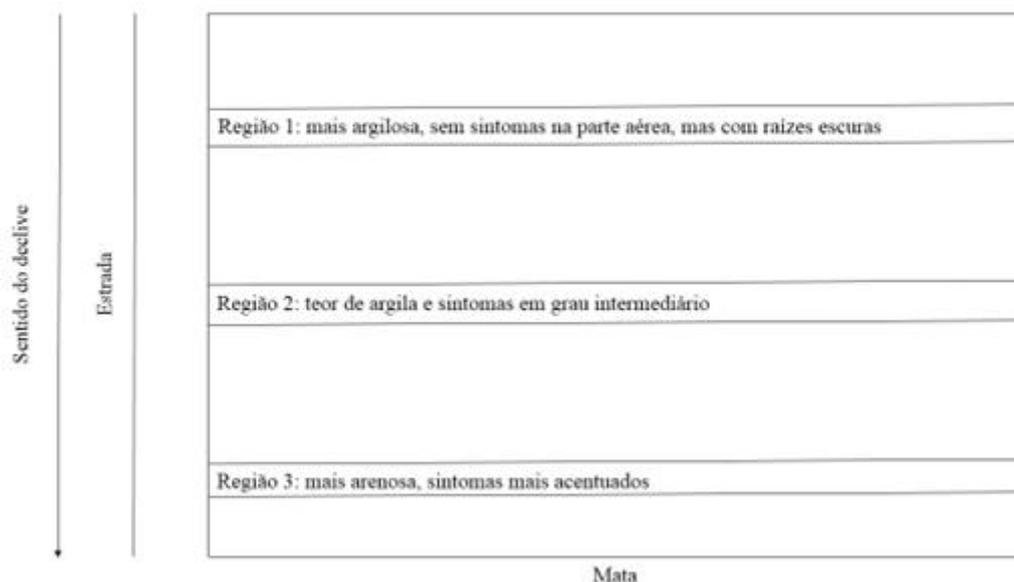


Figura 1: Esquema do talhão com áreas amostradas (Regiões 1 e 3) em 2010/11. **Fonte:** MACHADO, C.T.T. 2012. Relatório de atividades, Embrapa Cerrados, DF.

2.1.3 Oeste da Bahia (BA)

A Fazenda Assahi (12°32'59" S, 46°07'43" O) está localizada no município de São Desidério, BA. Essa fazenda possui características de um provável latossolo amarelo de textura média a arenosa. Cultura predominante de soja com eventual rotação com milho a cada 2-3 anos e sobressemeadura de milheto nas áreas mais infestadas com nematóides e, um sistema de plantio direto sem revolvimento.⁴

Localizada no município de Formosa do Rio Preto, BA, está a Fazenda Triunfo (11°26'32" S e 45°34'10" O). Sob condições de um provável latossolo vermelho-amarelo de textura média e, com cultura predominante de soja com eventual rotação com milho consorciado com *Brachiaria ruziziensis* a cada 2-3 anos. O sistema de é caracterizado por um cultivo mínimo.

A Fazenda Xanxerê (13°47'01" S e 46°00'13" O) está localizada no município de Correntina, BA, em um Neossolo Quartzarênico, com teor de argila variando entre 17 e 24%, fase cerrado típico (*strictu-sensu*) e relevo plano. A vegetação original das áreas em estudo foi removida no início dos anos de 1990, sendo cultivadas diversas culturas anuais de interesse comercial, desde o primeiro cultivo (MARCHÃO et. al., 2008)

O sistema de cultivo da Fazenda Xanxerê é constituído por rotações e consórcios em plantio direto e integração lavoura/pecuária, desde 2004, pelo menos, envolvendo as culturas de soja, algodão, milho, braquiária e feijão (MARCHÃO et. al., 2008).

⁴ Comunicação pessoal de Robélio Leandro Marchão, pesquisador da Embrapa Cerrados, em 2013.

No ano 2010/2011, por ocasião da amostragem para o presente trabalho, a área estava plantada com algodão.

2.2 Determinações da ocorrência de FMAs

2.2.1 Extração e contagem de esporos

Para separarmos os FMAs do solo e quantificarmos os mesmos, faz-se necessário a suspensão do material (solo e raízes) em água e posterior peneiramento, decantação e centrifugação. O procedimento utilizado nesse trabalho para extração de FMAs em amostras de solo para a sua quantificação se baseia na metodologia de Gendemann e Nicolson (1963). Estes autores adaptaram o procedimento de extração de nematóides do solo para extração de esporos de FMAs e é complementada pela metodologia de centrifugação em gradiente de densidade, também descrita para extração de nematóides do solo por Jerkins (1964). Este procedimento visa extrair esporos de FMAs de amostras de solo possibilitando sua quantificação e/ou identificação taxonômica (MIRANDA, 2008).

Amostras de solo de 50 ml foram separadas para a extração de esporos, tendo sido homogeneizadas em aproximadamente 800 ml de água em liquidificador, por aproximadamente dez segundos. Em seguida, o sobrenadante foi vertido cuidadosamente sobre peneiras de 710 e 53 μm , acopladas em ordem decrescente (Figura 2). O processo foi repetido por no mínimo quatro vezes, descartando-se, por fim, os resíduos do fundo do recipiente do liquidificador (MIRANDA, 2008).

O material retido na peneira de malha mais fina foi transferido para um tubo Falcon e submetido à centrifugação por quatro minutos em solução aquosa a 3000 rpm. Após esta etapa, os esporos ficaram retidos no fundo do tubo e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, procedeu-se a uma centrifugação em 50 ml de solução de sacarose (450 g de açúcar cristal por litro de água destilada) por três minutos a 2000 rpm. Ao final deste processo, os esporos se encontraram na superfície do tubo devido ao gradiente de concentração (MIRANDA, 2008).

Esse material sobrenadante foi vertido em uma peneira de 53 μm e lavado com água em abundância. Depois de lavado, o material foi colocado em placas canaletadas (Figura 3) para a observação e contagem dos esporos, com o auxílio de um microscópio estereoscópico (MIRANDA, 2008).

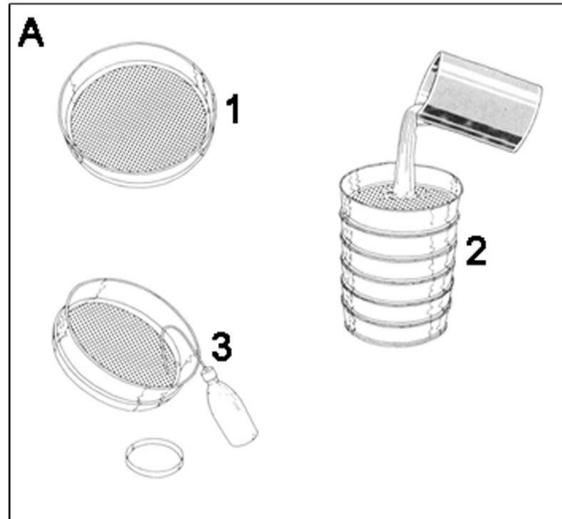


Figura 2: Passos da técnica de peneiramento úmido (adaptado de Pacioni, 1994): 1 – Peneira metálica; 2 - Suspensão de solo passando pelas peneiras; 3 – Recolhimento de esporos para placa de Petri.

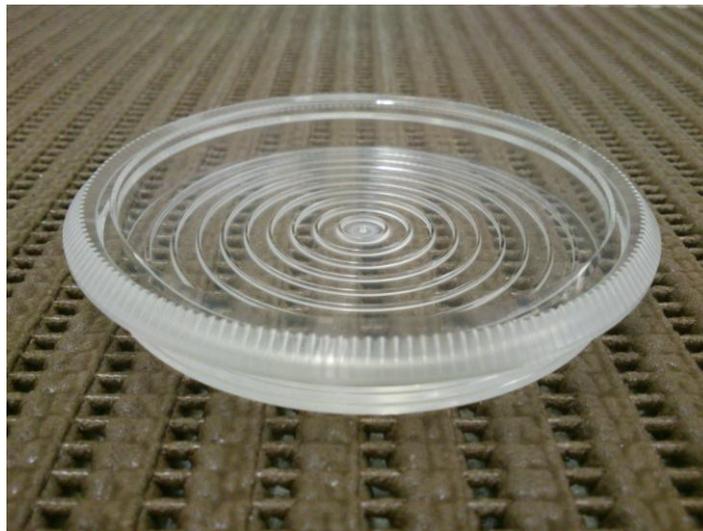


Figura 3: Placa canaletada utilizada para a avaliação dos esporos.
Foto: ALENCAR, C.G.R. 2012. Atividade laboratorial, Embrapa Cerrados, DF.

2.2.1 Estimativa de potencial de inóculo

A partir de amostras de solos originais de todas as coletas e locais, bioensaios foram conduzidos em casa de vegetação para estimar o potencial de inóculo, a partir da metodologia proposta por Moormam e Reeves (1979), utilizando-se sorgo como planta teste. O método se fundamenta na premissa que a planta hospedeira é colonizada por uma população de FMAs nativos de uma forma que corresponde ao potencial de infecção (infectividade) da população de FMAs a partir dos diversos propágulos desse fungo no solo.

Um volume de 250 ml de solo original foi colocado em tubetes, onde a planta micotrófica teste (sorgo) foi semeada. Entre a sexta e a oitava semana após o plantio, as

raízes das plantas foram colhidas para a quantificação da porcentagem de infecção, sendo coradas segundo a metodologia adaptada daquelas propostas por Phillips e Hayman (1970), com adaptações feitas por Koske e Gemma (1989) e Grace e Stribley (1991) modificando concentrações e alterando reagentes que diminuíssem os riscos de toxicidade. Na instalação dos bioensaios, os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições. A irrigação foi feita diariamente com água destilada, conforme a necessidade das plantas.

As raízes mais finas foram preferencialmente escolhidas, já que o oposto são as principais limitações do método. Foram selecionadas amostras de 1 g de raízes. As amostras de raízes foram postas em solução de hidróxido de potássio 2,5%, geralmente de 20 a 30 ml, por 24 horas em temperatura ambiente. Esta etapa é conduzida para que o corante, ácido, interaja com as raízes. Após esta etapa, as raízes foram deixadas em solução de ácido clorídrico 1% (m/v) por 24 horas, onde foram acidificadas para a próxima etapa.

Para a etapa de coloração, as raízes foram colocadas em solução de azul de metila 0,05% (m/v) em solução de glicerol ácida por também 24 horas. Após o tempo determinado, as raízes são colocadas em placas de Petri para a determinação da porcentagem de colonização.

A porcentagem de colonização das raízes foi determinada pelo método da interseção em placas sob microscópio estereoscópico (GIOVANETTI e MOSSE, 1980).



Figura 4: Bioensaios conduzidos em casa de vegetação utilizando sorgo como planta teste para determinação do potencial de infecção. **Foto:** ALENCAR, C.G.R. 2011. Atividades em casa de vegetação, Embrapa Cerrados, DF.

2.2.3 Quantificação das proteínas do solo relacionadas à glomalina

A extração de glomalina das amostras de solo com citrato de sódio, posteriormente quantificada pela reação de Bradford, foi feita seguindo a metodologia de Wright e Upadhyaya (1996).

Amostras de solos das áreas experimentais foram pesadas em replicatas de 1 g e colocadas em estufa a 60° C por 48 horas para secagem. As replicatas, de 1 g de cada amostra, foram colocadas em tubos Falcon com capacidade para 50 ml, onde se adicionou 8 ml de tampão citrato de sódio 20mM, pH 7,0, em cada tubo, que serão autoclavados por 30 minutos a 121° C. Em seguida os frascos foram centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos.

Para determinar a concentração de glomalina, foi pipetado 100 µl do extrato em tubo de ensaio, aos quais se adicionou 2 ml do reagente de Bradford. Em seguida, os tubos foram agitados em vórtex, aguardando 10 minutos para iniciar leitura de absorbância em espectrofotômetro a 595 nm.



Figura 5: Eppendorfs contendo extratos para quantificação de glomalina.
Foto: MACHADO, C.T.T. 2012. Atividade laboratorial, Embrapa Cerrados, DF

2.2.4 Análises estatísticas

Os dados de contagem de esporos dos FMAs e as porcentagem de colonização foram transformados, respectivamente, em $[\log(x+1)]$ e $\text{arc sen } (x/100)^{0,5}$ antes das análises estatísticas. As médias relacionadas às variáveis número de esporos, porcentagem de colonização e proteínas do solo relacionadas à glomalina foram submetidas à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Distrito Federal (DF): Fazenda Sementes Primavera

Na área amostrada sob cultivo de soja na Fazenda Sementes Primavera, verificou-se um maior número de esporos dentro da reboleira (Figura 6.1).

Comportamento semelhante foi observado para o potencial de inóculo nestas áreas, determinado pela porcentagem de colonização das raízes de sorgo (Figura 6.2), entretanto a diferença não foi significativa para este parâmetro. Para a glomalina, os teores da proteína foram semelhantes dentro e fora das reboleiras (Figura 6.3).

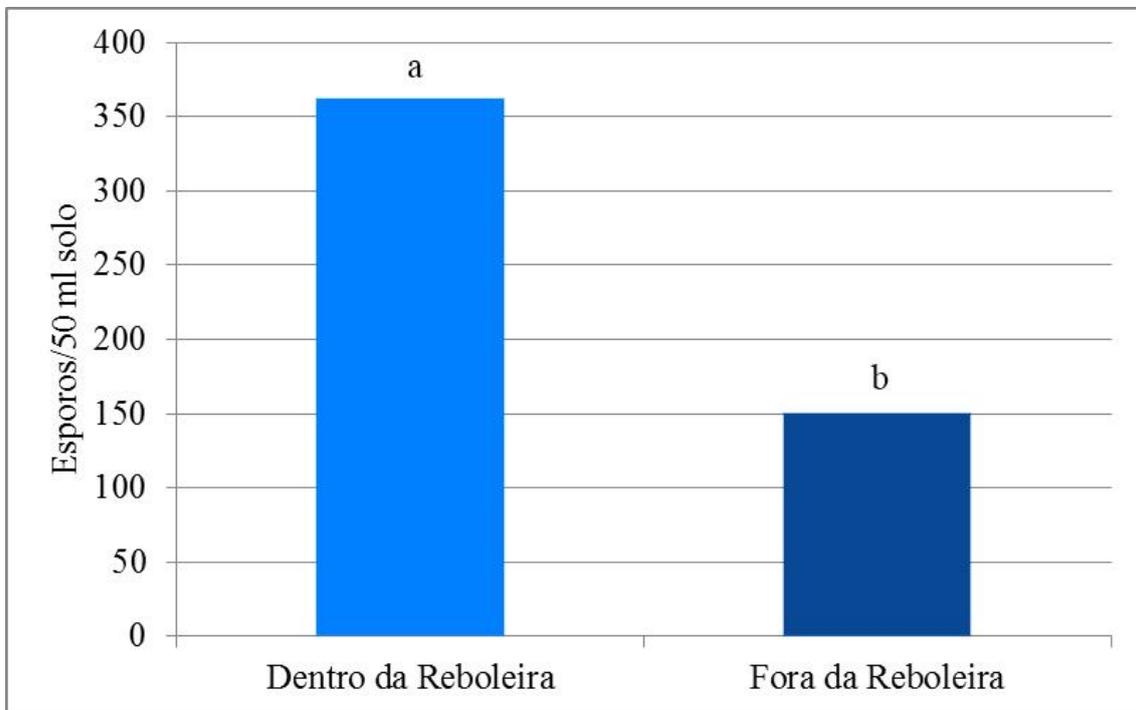


Figura 6.1: Número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares do solo sob lavoura de soja, dentro e fora das reboleiras, na Fazenda Sementes Primavera, em Planaltina (DF). Ano agrícola 2010/2011. Média de 5 repetições.

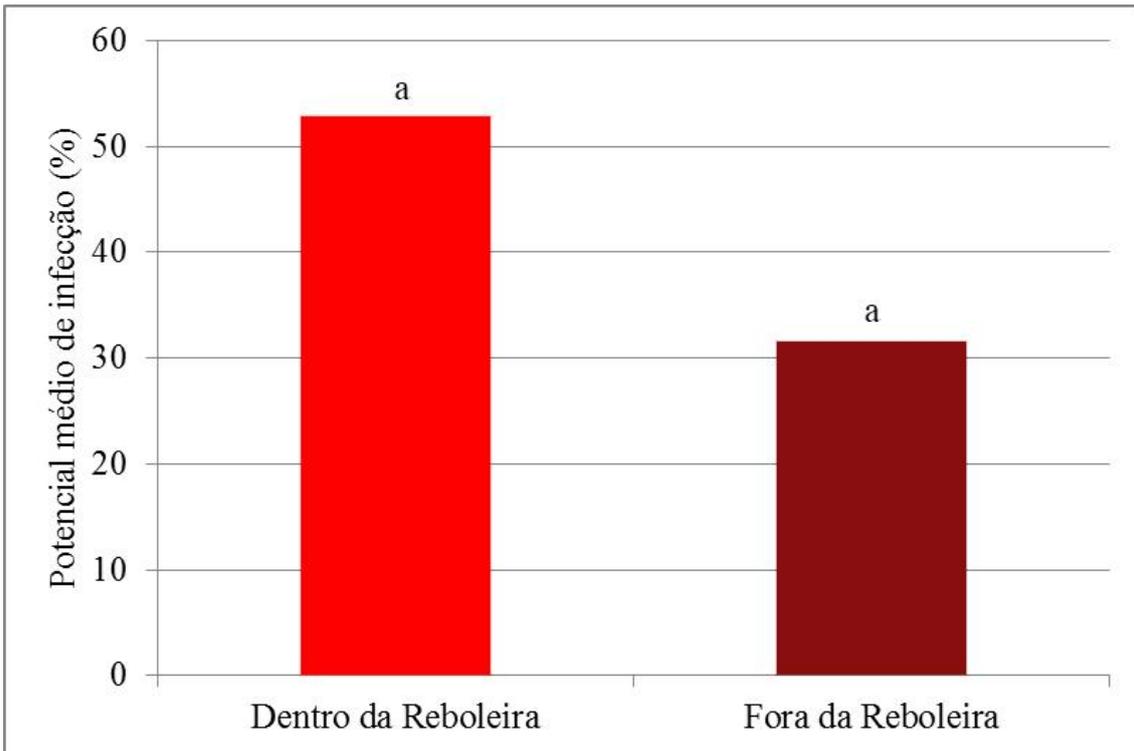


Figura 6.2: Potencial médio de infecção (% de colonização das raízes de sorgo) de solo sob lavoura de soja, dentro e fora das reboleiras, na Fazenda Sementes Primavera, em Planaltina (DF). Ano agrícola 2010/2011. Média de 5 repetições.

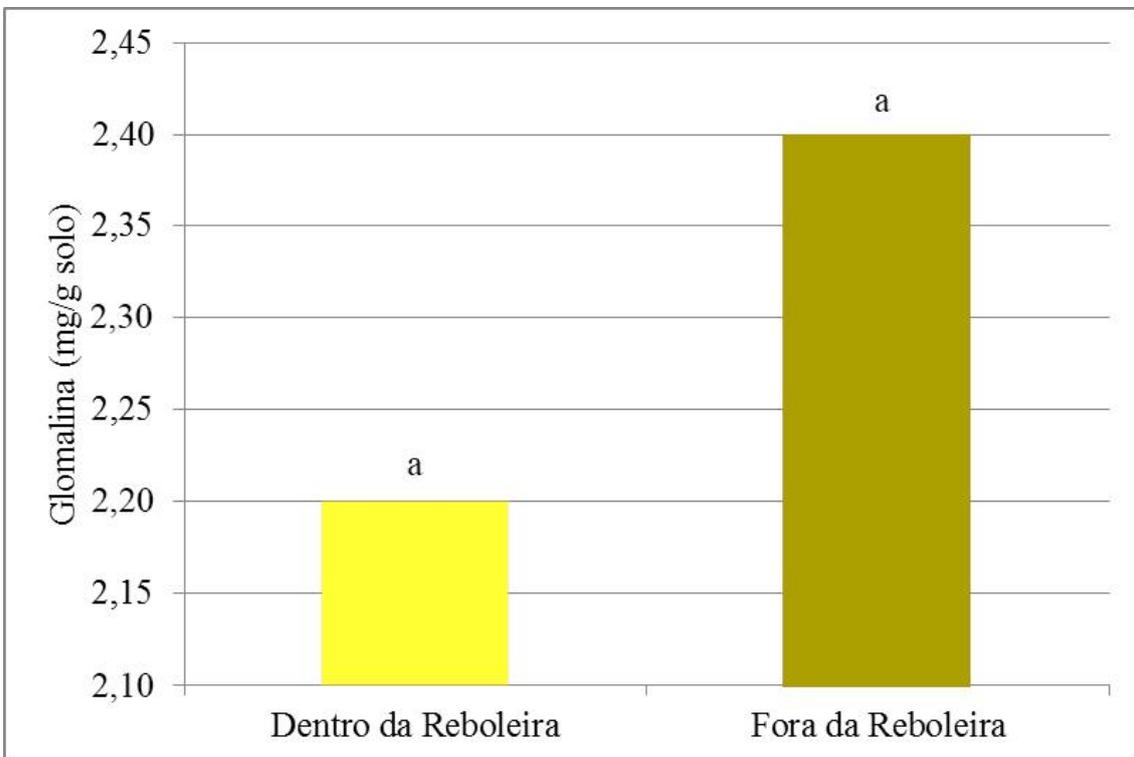


Figura 6.3: Teor de glomalina de solo sob lavoura de soja, dentro e fora das reboleiras, na Fazenda Sementes Primavera, em Planaltina (DF). Ano agrícola 2010/2011. Média de 5 repetições.

3.2 Mato Grosso (MT): Fazenda Dacar

Na área amostrada no município de Vera (MT), Fazenda Dacar, sob cultivo de soja, foi observado (Figura 7.1) um maior número de esporos fora das zonas de ataque dos nematóides (“reboleiras”) do que em relação ao número de esporos dentro das zonas de ataque dos nematóides (“fora da reboleira”), enquanto que o oposto foi verificado para o potencial de inóculo determinado pela porcentagem de colonização. Entretanto, essas diferenças não foram significativas (Figura 7.2). Para os teores de glomalina, os valores se mostraram análogos dentro e fora da reboleira (Figura 7.3).

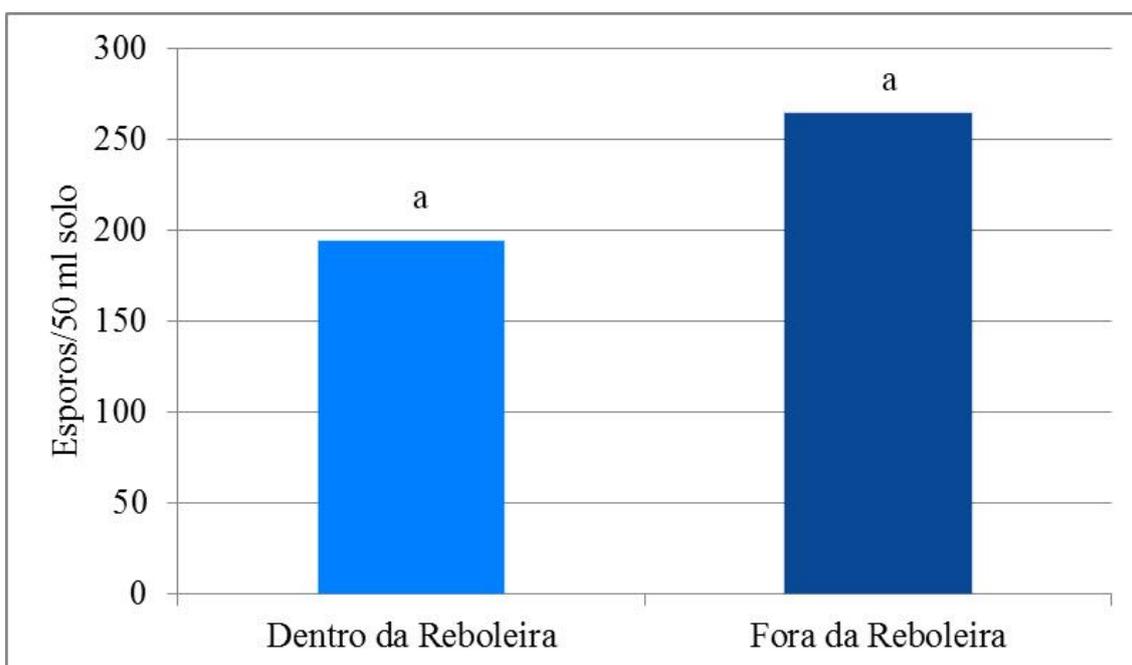


Figura 7.1: Número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares do solo sob lavoura de soja, dentro e fora das reboleiras, na Fazenda Dacar, em Vera (MT) Ano agrícola 2010/2011. Média de 3 repetições.

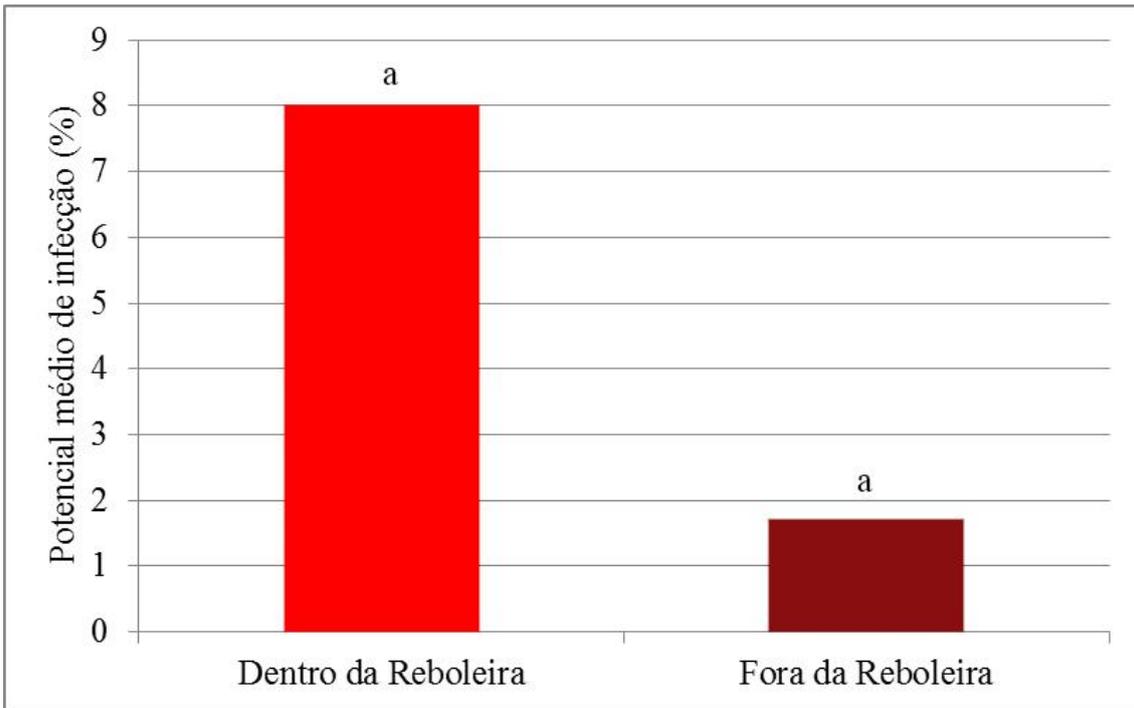


Figura 7.2: Potencial médio de infecção (% de colonização das raízes de sorgo) de solo sob lavoura de soja, dentro e fora das reboleiras, na Fazenda Dacar, em Vera (MT) Ano agrícola 2010/2011. Média de 3 repetições.

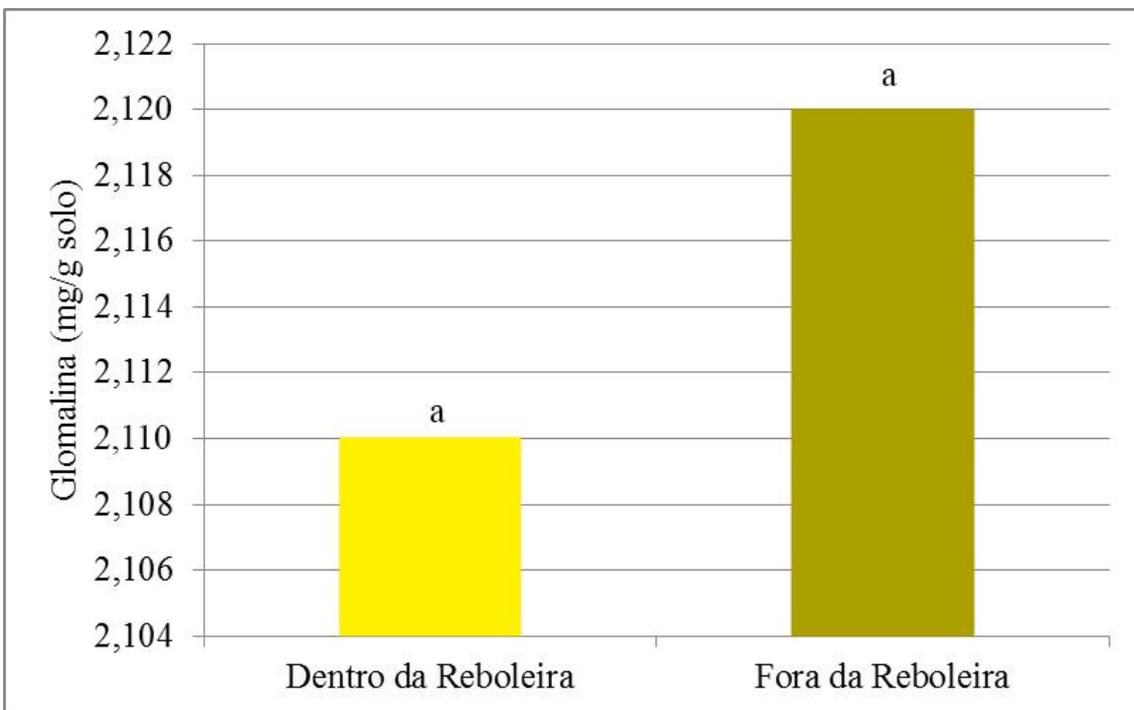


Figura 7.3: Teor de glomalina de solo sob lavoura de soja, dentro e fora das reboleiras, na Fazenda Dacar, em Vera (MT) Ano agrícola 2010/2011. Média de 3 repetições.

3.3 Oeste da Bahia (BA): Fazendas Assahi, Triunfo e Xanxerê

Na Fazenda Assahi e na Fazenda Triunfo, os resultados das análises mostraram que não houve diferença significativa entre a densidade de esporos dentro e fora da reboleira, em plantio de soja, mesmo com um número maior de esporos fora das zonas de ataque dos nematóides (Figura 8.1).

Ausência de diferenças estatísticas também foi verificada para o potencial de inóculo e teores de glomalina em ambas as fazendas, comparando as amostragens dentro e fora das reboleiras (Figuras 8.2 e 8.3).

Na Fazenda Xanxerê, sob cultivo de algodão, a densidade de esporos apresentou-se maior fora da reboleira (Figura 8.1). Para o potencial de inóculo, representado pela porcentagem média de infecção, foi constatado valor maior para dentro da reboleira (Figura 8.2). Por fim, os teores de glomalina apresentaram-se maiores dentro da reboleira (Figura 8.3). Vale ressaltar que para nenhuma dessas características houve diferença significativa.

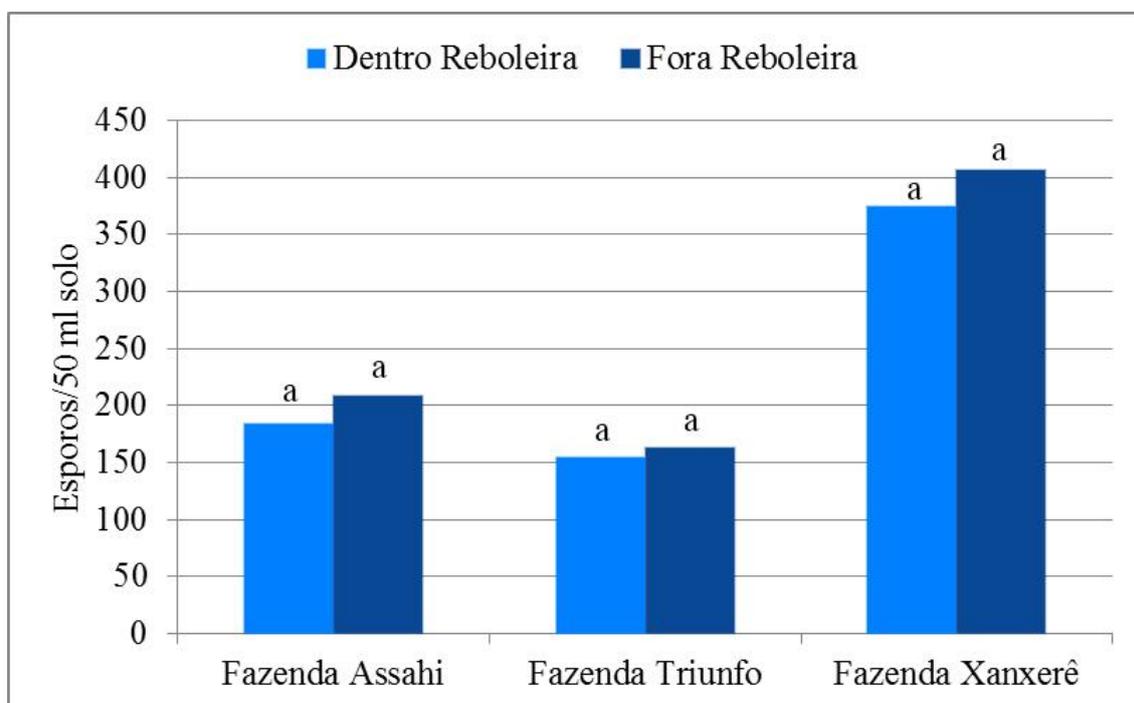


Figura 8.1: Número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares dos solos sob lavouras de soja (Fazendas Assahi e Triunfo) e algodão (Fazenda Xanxerê) no oeste baiano, afetadas ou não por nematóides do gênero *Pratylenchus*. Ano agrícola 2010/2011. Média de 3 repetições.

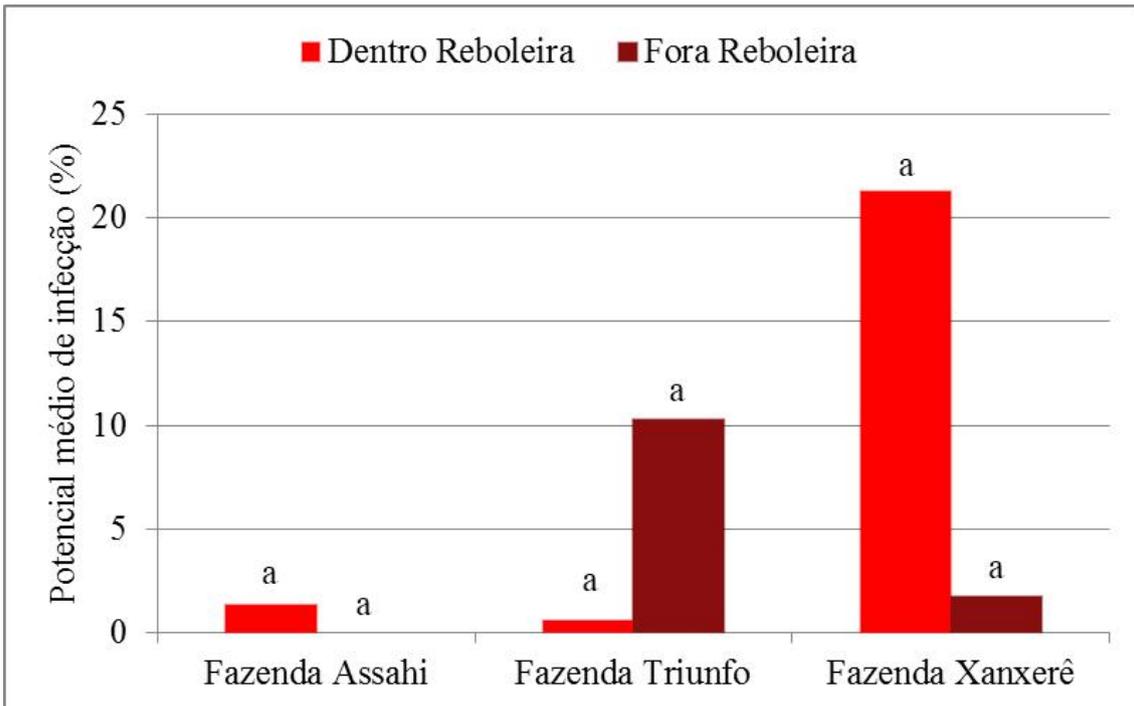


Figura 8.2: Potencial médio de infecção (% de colonização das raízes de sorgo) dos solos sob lavouras de soja (Fazendas Assahi e Triunfo) e algodão (Fazenda Xanxerê) no oeste baiano, afetadas ou não por nematóides do gênero *Pratylenchus*. Ano agrícola 2010/2011. Média de 3 repetições.

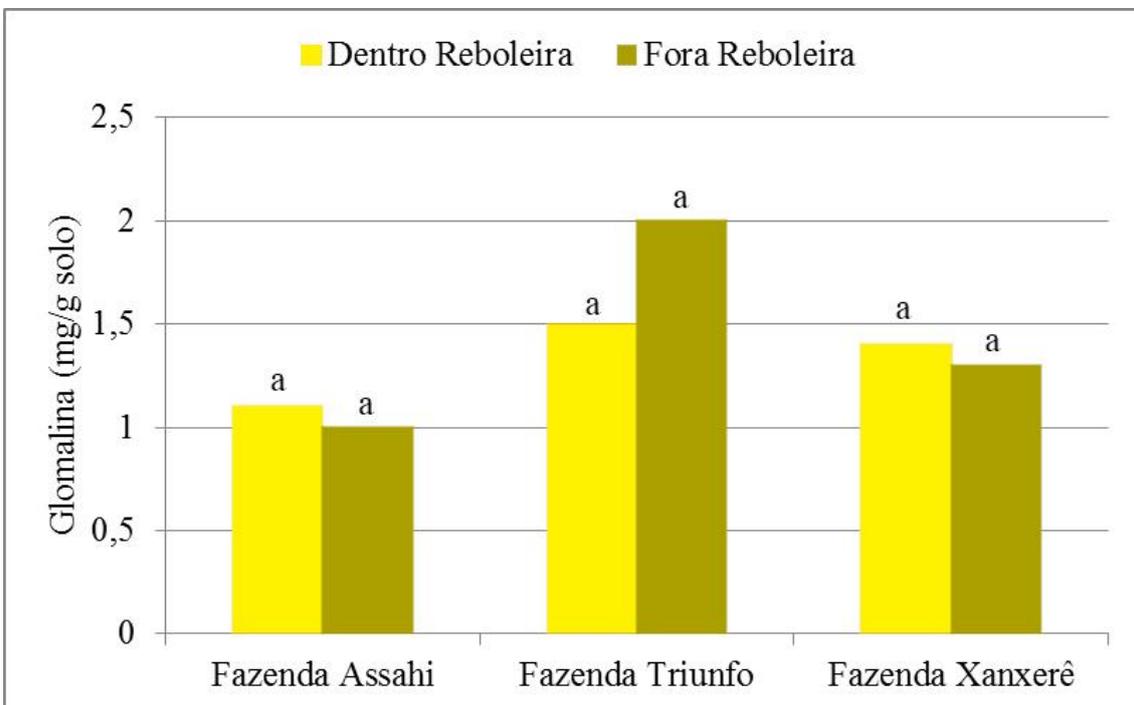


Figura 8.3: Teor de glomalina nos solos sob lavouras de soja (Fazendas Assahi e Triunfo) e algodão (Fazenda Xanxerê) no oeste baiano, afetadas ou não por nematóides do gênero *Pratylenchus*. Ano agrícola 2010/2011. Média de 3 repetições.

Dos resultados apresentados acima, comparando as propriedades agrícolas amostradas, observou-se uma tendência de menor número de esporos nas áreas denominadas “dentro da reboleira”. Na Fazenda Primavera, ao contrário, ocorreu um número de esporos significativamente menor “dentro da reboleira” quando comparado com “fora da reboleira”. Nesta propriedade agrícola, o potencial de inóculo foi ligeiramente superior “dentro da reboleira”, semelhante ao que se observou nas Fazendas Dacar e Triunfo, sob cultivo de soja e Xanxerê, sob cultivo de algodão.

Os solos da Fazenda Primavera apresentaram menor potencial de inóculo que os demais e os teores de glomalina foram muito semelhantes em todas as propriedades e cultivos. Portanto, observa-se que os dados não são conclusivos, representando uma situação específica, que para ser interpretada depende de outros fatores.

Todas as fazendas estão localizadas em condições de latossolo, exceto pela fazenda Xanxerê que está localizada em um neossolo quartzarênico. Isto indica a necessidade de uma maior atenção sobre cuidados com estes solos, tendo em vista a aptidão agrícola; as correções do solo no que diz respeito à acidez, à saturação por alumínio e à baixa fertilidade; o mantimento da cobertura do solo a maior parte do tempo possível, especialmente no início das chuvas e; em especial às condições da Fazenda Xanxerê: atenção sobre os teores de areia grossa maiores que os de fina e a retenção de água; suscetibilidade à erosões (CORREIA et al., 2002)

Um dos fatores principais é a população de nematóides. Considerando que o projeto encontra-se em andamento, as análises relativas a este parâmetro estão sendo realizadas e os resultados não foram disponibilizados.

Existem as hipóteses de que a população e a colonização das plantas por FMAs são afetadas pela população de nematóides e que plantas colonizadas por estes fungos, pelo possível melhor estado nutricional, possam ser mais resistentes ao ataque do patógeno. Isto se baseia na ordem de ocupação dos sítios. Na ausência das informações sobre população de nematóides não se pode inferir a respeito desse efeito.

Outro fator é a textura dos solos. Tem se observado que solos de textura média e/ou arenosos favorecem o ataque de *Pratylenchus* ou que os danos são maiores nestas situações. Solos arenosos favorecem *P. brachyurus* (ENDO, 1959) e, a porcentagem de areia do solo e a quantidade de chuva estão positivamente relacionadas a incidência de *P. penetrans* (JORDAAN et al., 1989). Essa condição de solo é “comum” a todas as áreas amostradas. Para a Fazenda Dacar, especificamente, solos da porção mais arenosa mostraram maior dano por *Pratylenchus* e em solos da porção mais argilosa, menores danos causados por esse patógeno⁵.

Considerando a questão da ocorrência dos *Pratylenchus* dentro e fora das reboleiras, não houve um padrão que descrevesse a população. Nos trabalhos que estão sendo produzidos no presente projeto, ora a população é maior dentro da reboleira, ora

⁵ Comunicação pessoal de Henrique Debiasi, pesquisador da Embrapa Soja, em 2012.

fora da reboleira⁶, da mesma forma que se observou para FMAs e que tem sido observado para alguns fungos fitopatogênicos⁷.

Uma das possibilidades da menor população de nematóides dentro da reboleira é a ausência de raízes, uma vez que a cultura já foi dizimada ou bastante prejudicada. Isso remete à posição de amostragem. Devido ao grande potencial de migração desses nematóides, não é possível estabelecer com clareza se os nematóides estão se movimentando de dentro para fora da reboleira em busca de “substrato”, nesse caso, raízes para serem parasitadas.

Os sistemas de manejo dos cultivos também influenciam a população tanto de FMAs quanto de nematóides. Para os FMAs é sabido que algumas espécies vegetais multiplicam melhor os fungos. Entre as espécies que podem aumentar a população de FMAs e controlar os nematóides, estão algumas crotalárias (MIRANDA, 2008). Isso se apresenta como uma estratégia de redução de danos: combinação de sistemas de manejo com cultivos que reduzem a população de nematóides e aumentam a de FMAs, simultaneamente.

O manejo da fertilidade também é muito importante. Plantas bem nutridas resistirão mais ao ataque de nematóides. Por outro lado, excesso de nutrientes tende a reduzir a população de FMAs (MIRANDA, 2008)

Assim, reafirmo a necessidade de informações relativas a essas características para uma melhor discussão dos resultados. Os poucos trabalhos existentes dificultam o acesso a mais informações. Até o momento, os trabalhos sobre interações entre *Pratylenchus* e fungos micorrízicos arbusculares foram realizados somente fora do Brasil, em condições edafoclimáticas bastante diferentes das observadas no cerrado.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muito embora os resultados do presente trabalho sejam preliminares e careçam de muitas outras informações sobre fatores que ocorrem conjuntamente e potencializam ou amenizam os danos por nematóides do gênero *Pratylenchus*, estes reforçam a importância dos trabalhos de pesquisa com este nematóide. A severidade dos danos, a gravidade dos ataques e as consequentes perdas para o rendimento de importantes culturas no Cerrado atestam isso, e a falta de padrão de resultados reafirma a necessidade de continuidade destas pesquisas que se concentram nos múltiplos fatores que interferem na resposta das plantas a este patógeno.

⁶ Comentários feitos durante o II Workshop sobre Nematóides do Gênero *Pratylenchus*, Embrapa Cerrados, 27 e 28 de novembro de 2012.

⁷ Comunicação pessoal de José Ribamar Nazareno dos Anjos, pesquisador da Embrapa Cerrados, 2012

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZCÓN-AGUILLAR, C.; JAIZME-VEGA, M. C. CALVET, C. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the control of soilborne pathogens. In: GIANINAZZI, S.; SCHÜEPP, H.; BAREA, J. M.; HASEELWANDTER, K. (eds). Mycorrhizal technology in agriculture. Basel: Verlag, p. 187-197, 2002.
- CALVET, C.; PINOCHET, J.; CAMPRUBÍ, A.; FERNANDEZ, C. Increased tolerance to the root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* in mycorrhizal propagated BA-29 quince rootstocks. **Mycorrhiza**, v.5, p. 253-258, 1995
- CAMPRUBÍ, A.; PINOCHET, J.; CALVET, C.; ESTAÚN, V. Effects of the root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* and the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on the growth of three plum rootstocks. **Plant and Soil**, v. 153, 223-229, 1993.
- CORREIA, J. R.; REATTO, A.; SPERA, S. T. Solo e suas relações com o uso e o manejo. In: SOUSA, D. M. G. de; LOBATO, E. (Ed.). Cerrado: correção do solo e adubação. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2002. p. 29-61.
- ELLIOT, A. P.; BIRD, G. W.; SAFIR, G. R. Joint influence of *Pratylenchus penetrans* (Nematoda) and *Glomus fasciculatum* (Phycomyceta) on the ontogeny of *Phaseolus vulgaris*. **Nematropica**, v.14, p. 111-119, 1984.
- ELSEN, A.; BAIMEY, H.; SWENNEN, R.; DE WAELE, D. Relative mycorrhizal dependency and mycorrhiza-nematode interaction in banana cultivars (*Musa* spp.) differing nematode susceptibility. **Plant and Soil**, v.256, p.303-313, 2003.
- ENDO, B.Y. Responses of root-lesion nematodes, *Pratylenchus brachyurus* and *P. zaeae*, to various plants and soil types. *Phytopathology*, St. Paul, v. 49, p. 417-421, 1959.
- FERNANDES, S. G. *Fertilidade do solo e atividade micorrízica em áreas de agricultores familiares no norte de Minas Gerais*. 2011. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.
- GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal Endogene species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of British Mycological Society*, Cambridge, v. 46, n.2, p.235-244, Junho 1963.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *The New Phytologist*, v.84, n.3, p.484-500, 1980.
- GOULART, A.M.C. Aspectos gerais sobre nematóides-das-lesões-radiculares (gênero *Pratylenchus*). Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008. 30 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 219.
- GRACE, C.; STRIBLEY, D.P. A safer procedure for routine staining of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research*, v.95, n.10, p.1160-1162, 1991
- JAIZME-VEGA, M. C.; PINOCHET, J. Growth response of banana to three mycorrhizal fungi in *Pratylenchus goodeyi* infested soil. **Nematropica**, v.27, p. 264-266, 1997.
- JERKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Report*, Beltsville, v.48, p.692, 1964.
- JORDAAN, E.M.; WAELE, D. de; VAN ROOYEN, P.J. Endoparasitic nematodes in corn roots in the western Transvaal as related to soil texture and rainfall. *Journal of Nematology*, St. Paul, v. 21, p. 356-360, 1989.
- JOTHI, G.; SUNDARABABU, R. Studies on the management of root lesion nematode, *Pratylenchus zaeae* with the endomycorrhizal fungus, *Glomus fasciculatum* on corn. **Indian Journal of Nematology**, v.27, p. 264-266, 1997.

- KOSKE, R.E.; GEMMA, J.N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycological Research*, Cambridge, v.92, n.4, p.486-488, June 1989.
- LIU, R. J.; LUO, X. S. A. A new method to quantify the inoculum potential of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, Oxford, v. 128, n. 1, p. 89-92, Sep. 1994.
- MARCHÃO, R.L.; VILELA, L.; BENITO, N.P.; SANTOS, B.D. dos. Macrofauna edáfica sob diferentes sistemas de manejo num neossolo quartzarênico do cerrado do oeste baiano. In: IX Simpósio Nacional Cerrado; II Simpósio Internacional Savanas Tropicais; Brasília, 2008.
- MENDES, F.L.; ANTONIO, S.F.; DEBIASI, H.; FRANCHINI, J.C.; DIAS, W.P.; RAMOS JUNIOR, E.U.; SILVA, J.F.V. Manejo cultural do nematóides das lesões radiculares durante a entressafra da soja no Mato Grosso. Londrina: Embrapa Soja, 2012. p. 46-54 (Embrapa Soja. Documentos, 333).
- MIRANDA, J.C.C. **Cerrado**: micorriza arbuscular: ocorrência e manejo. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. 169p.
- MOORMAN, T.; REEVES, F.B. The role of endomycorrhizae in revegetation practices in the semi-arid west. II. A bioassay to determine the effect of land disturbance on endomycorrhizal populations. *Amer. J. Bot.* 66, 14-18, 1979.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002. 626p.
- PACIONI, G. Wet sieving and decanting techniques for the extraction of spores of vesicular – arbuscular fungi. In: NORRIS, J.R.; READ,D.J.; VARMA, A.K. **Methods in microbiology**: techniques for mycorrhizal research. London: Academic Press, 1994. P. 777-782
- PHILIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedure for cleaning roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transaction of the British Mycological Society*, v.55, p.158-161, 1970.
- PURIN, S.; KLAUBERG FILHO, O. Glomalina: nova abordagem para entendermos a biologia dos fungos micorrízicos arbusculares. In: SIQUEIRA, J. O.; SOUZA, F. A.; CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M. (Eds.). **Micorrizas**: 30 anos de pesquisa no Brasil. Lavras: Ed. UFLA, 2010. 716 p.
- RILLING, M.C. Arbuscular mycorrhizae, glomalina, and soil agregation. *Can. J. Soil Sci.*, 84:355-363, 2004.
- SÁ, M.A.C.; SANTOS JUNIOR, J.D.G.; RESENDE, A.V.; VILELA, M.F.; SHIRATSUSHI, L.S. **Variabilidade espacial da massa seca da parte aérea de soja relacionada com atributos do solo no cerrado**. In: IX Simpósio Nacional Cerrado; II Simpósio Internacional Savanas Tropicais; Brasília, 2008.
- SIEVERDING, E. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Eschborn: Deutsche Gesellschaft fur Technische Zusammenarbeit, 1991. 371 p.
- SMITH, G. S. The role of phosphorus nutrition in interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi with soilborne nematodes and fungi. **Phytopathology**. V.78, p. 371-374, 1988.
- SYLVIA, D. M.; WILLIAMS, S. E. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and environmental stresses: In: BETHLENFALVAY, G. J.; LINDERMAN, R. G. **Mycorrhizae in sustainable agriculture**. Madison: ASA/CSSA/SSA, 1992. p. 101-124.
- TALAVERA, M.; ITOU, K.; MIZUKUNO, T. Reduction of nematode damage by root colonization with arbuscular mycorrhiza (*Glomus* spp.) in tomato-*Meloidogyne incognita* and carrot-*Pratylenchus penetrans* pathosystems. **Applied Entomology and Zoology**, v. 36, p. 387-392, 2001.
- VAAST, P.; CASWELL-CHEN, E. P.; ZASOSKI, R. J. Influences of a root-lesion nematode, *Pratylenchus coffeae*, and two arbuscular mycorrhizal fungi, *Acaulospora mellea* and *Glomus clarum* on coffee (*Coffea Arabica* L.). **Biology and Fertility os Soils**, v.26, p.130-135, 1998.

WALLACE, H. R. Effects of nematode parasite on photosynthesis. In: VEECH, J. A.; DICKSON, D. W. (eds). **Vistas on nematology**. Hyattsville: Society of Nematologists. P. 253-259, 1987.

WRIGHT, S. F.; FRANKEE-SNYDER, M.; MORTON, J. B. Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during tactive colonization of roots. *Plant and Soil*, v. 181, p. 193-203, 1996.

WRIGHT, S.F.; UPADHYAYA, A. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein or arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science*, v.161, n.9, p. 575-586, 1996.