



## COMPONENTES BIOQUÍMICOS E CRESCIMENTO DE MELOEIRO SOB ESTRESSE HÍDRICO ASSOCIADO À *MELOIDOGYNE INCOGNITA* E *BACILLUS SPP.*

Carmem Cristina Mareco de Sousa Pereira<sup>1</sup>, Elvira Maria Regis Pedrosa<sup>2</sup>, Mario Monteiro Rolim<sup>2</sup>, Enio Farias França e Silva<sup>2</sup> e João Valdenor Pereira Filho<sup>3</sup>.

### RESUMO

O objetivo da pesquisa foi avaliar o efeito da interação estresse hídrico × *Bacillus* spp. ENM51 × *Meloidogyne incognita* sobre variáveis de crescimento da planta, enzimas e teores de fósforo e nitrogênio do meloeiro amarelo cultivar Gold Mine em casa de vegetação. O estresse hídrico de 50% da capacidade do pote diminuiu o comprimento da haste, o número de folhas, o índice de área foliar e as biomassas frescas e secas das plantas. O comprimento e as biomassas fresca e seca da haste, a biomassa fresca total e o número de folhas e de flores foram prejudicados pelo parasitismo por *M. incognita*. A inoculação com *Bacillus* spp. contribuiu para a diminuição da reprodução do nematoide e número de galhas. O efeito do estresse hídrico na biomassa fresca das raízes foi minimizado nas plantas inoculadas com a bactéria. O estresse hídrico proporcionou aumentos dos níveis de proteína solúvel e ascorbato peroxidase nas plantas. As variações nos níveis de proteína solúvel promovidas pelo estresse hídrico como também as promovidas pela ação do nematoide foram inibidas nas plantas associadas à *Bacillus* spp. Os teores de peroxidase, polifenoloxidase, catalase, prolina, fósforo e nitrogênio não foram alterados com o estresse e presença de *M. incognita* e *Bacillus* spp.

**Palavras-chave:** *Cucumis melo*, nematoide de galhas, rizobactéria, enzimas, nutrientes

## BIOCHEMICAL COMPONENTS AND UNDER WATER STRESS MELON GROWTH ASSOCIATED TO *MELOIDOGYNE INCOGNITA* AND *BACILLUS SPP.*

### ABSTRACT

The objective of the research was to evaluate the effect of the interaction water stress × *Bacillus* spp. ENM51 × *M. incognita* on growth variables of the plant, enzymes and phosphorus and nitrogen yellow melon cultivate Gold Mine in the greenhouse. Water stress 50% of the pot capacity decreased the rod length, the number of leaves, leaf area index and

<sup>1</sup>Doutora em Engenharia Agrícola pela UFRPE, e-mail: [crismareco@hotmail.com](mailto:crismareco@hotmail.com)

<sup>2</sup>Professores Associados da UFRPE, e-mails: [elvira.pedrosa@deagri.ufrpe.br](mailto:elvira.pedrosa@deagri.ufrpe.br); [rolim@deagri.ufrpe.br](mailto:rolim@deagri.ufrpe.br); [enio.silva@deagri.ufrpe.br](mailto:enio.silva@deagri.ufrpe.br)

<sup>3</sup> Doutor Professor de EMI pelo CENTEC, e-mail: [joao\\_valdenor@hotmail.com](mailto:joao_valdenor@hotmail.com)

fresh and dry biomass of plants. The length and fresh biomass and stem dry, total fresh weight and number of leaves and flowers were harmed by parasitism by *M. incognita*. The strains *Bacillus* spp. contributed to the reduction of the nematode reproduction and number of galls. The effect of water stress on fresh weight of roots was minimized in plants inoculated with the bacteria. Water stress provided increases in soluble protein levels and ascorbate peroxidase in plants. Changes in soluble protein levels promoted by water stress as well as those promoted by the action of the nematode were inhibited in plants associated with *Bacillus* spp. The peroxidase content, polyphenol oxidase, catalase, proline, phosphorus and nitrogen have not changed with stress and presence of *M. incognita* and *Bacillus* spp.

**Keywords:** *Cucumis melo*, root-knot nematode, rhizosphere bacteria, enzyme, nutrient

## INTRODUÇÃO

Nas regiões semiáridas, o parasitismo por nematoides de galhas (*Meloidogyne* Goeldi) constitui um dos maiores entraves para o desenvolvimento da cultura, pois causa significativas perdas para diversas culturas incluindo as olerícolas, inibindo iniciativas empresariais para a produção e exportação (BERNARDO et al., 2011). Os sintomas mais característicos do parasitismo desses nematoides aparecem nas raízes, que infectadas engrossam no ponto de penetração do juvenil, originando as galhas típicas e com a infecção, a absorção de água e nutrientes é afetada e o valor comercial da cultura é reduzido e, em casos mais graves, ocorre morte da planta (STEFFEN, 2007).

Entre os agentes de controle biológico que apresentam expressivo potencial para o controle de *Meloidogyne* spp. estão as bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) (LIU et al., 2012; XIAO et al., 2013) cuja eficiência está associada principalmente à produção de metabólitos tóxicos, alteração dos exsudatos radiculares ou indução de resistência à planta (FREITAS et al., 2005). Entre os mecanismos de ação que podem estar envolvidos no controle de fitopatógenos por BPCP, destacam-se a produção de sideróforos que podem inibir fungos fitopatogênicos (HAAS; DEFAGO, 2005), produção de antibióticos e enzimas que degradam a parede celular, competição por espaço e nutrientes, antibiose, parasitismo e indução de resistência (RAMAMOORTHY et al., 2001).

O uso de práticas de gestão eficiente para reduzir e manter a população de nematóides

abaixo do nível de danos é uma exigência da agricultura moderna. Por ter efeitos na promoção de crescimento e no biocontrole de doenças radiculares e foliares, reduzir custos de produção e diminuir o impacto dos agrotóxicos no meio ambiente, a associação de plantas com rizobactérias vem adquirindo importância crescente (FREITAS; AGUILAR-VILDOSO, 2004), sendo um campo promissor de investigação (FREITAS et al., 2005). O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do estresse hídrico e da associação com *Bacillus* spp. sobre componentes de crescimento, enzimas e teores de fósforo e nitrogênio em meloeiro parasitado por *Meloidogyne incognita*.

## MATERIAL E MÉTODOS

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

Foram utilizados vasos com 70 cm de altura e 58,0 cm de largura com solo do tipo Argissolo amarelo distrófico, textura franco arenosa, coletado no Município de Carpina, Pernambuco, na camada de 0,5 – 0,9 m, com as seguintes características: pH (H<sub>2</sub>O) = 4,6; Ca<sup>2+</sup> = 0,37 cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup>; Mg<sup>2+</sup> = 0,51 cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup>; Na<sup>+</sup> = 0,03 cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup>; K<sup>+</sup> = 0,04 cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup>; H<sup>+</sup> + Al<sup>3+</sup> = 2,84 cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup>; Al<sup>3+</sup> = 0,91 cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup>; S = 0,95 cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup>; T = 4,70 cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup>; C = 7,0 g kg<sup>-1</sup>; N = 0,3 g kg<sup>-1</sup>; M.O. = 23 g kg<sup>-1</sup>; P Assimilavel = 8 mg kg<sup>-1</sup>; e K = 0,04 mg dm<sup>3</sup>.

COMPONENTES BIOQUÍMICOS E CRESCIMENTO DE MELOEIRO SOB ESTRESSE HÍDRICO ASSOCIADO À *MELOIDOGYNE INCOGNITA* E *BACILLUS* SPP.

O solo foi inicialmente passado em peneira (5 mm), autoclavado (120 °C, pressão de 101 kPa), duas vezes, durante 1 hora e 30 min, com intervalo de 24 h, e utilizado 10 dias após a desinfestação. O delineamento estatístico adotado foi de blocos ao acaso, em esquema fatorial de 2 (com e sem estresse hídrico) × 2 (com e sem nematoide) × 2 (com e sem bactéria), com 8 repetições, totalizando 64 parcelas. O nível de estresse adotado foi de 50% da capacidade do pote. A capacidade do pote foi adotada como o conteúdo de água retida no solo, após sofrer saturação e consequente ação da gravidade, até o cessamento da drenagem (SOUZA et al. 2000).

A irrigação foi controlada com pesagem diária dos vasos em balança de precisão com sensibilidade de 1 g, entre 7 e 9 horas da manhã, e posterior reposição da água evapotranspirada no período, mantendo-se os vasos das plantas sem estresse próximos à capacidade de campo e omitindo-se a irrigação em 50% da capacidade do pote naqueles tratamentos sob condições de estresse.

A bactéria, do gênero *Bacillus* sp. (ENM51), foi isolada de meloeiro sadio e preservada pelo método de água destilada esterilizada (DE VA; SCHNATHRST, 1963). O inóculo foi preparado espalhando-se uniformemente o isolado em toda a superfície do meio NYDA (dextrose 10, extrato de carne 3, extrato de levedura 5, ágar 18 g/l de água destilada), em placas de Petri, com uma espátula de Drigalsky. As placas foram incubadas em câmara incubadora para DBO (Demanda Bioquímica do Oxigênio) por 48 horas, a 30 ° C. Dependendo da cor e do crescimento das colônias isoladas, no médio prazo ( $\pm$  72 horas), estas foram purificadas. Em seguida, os isolados foram submetidos aos testes do Gram e crescimento em meio King B (SCHAAD et al., 2001). Após o crescimento bacteriano foi preparada uma suspensão e, que em espectrofotômetro, foi ajustada para 570 nm e absorvância 0,7 e inoculada em meloeiro, 20 dias após a germinação, usando-se 20 mL de suspensão bacteriana planta<sup>-1</sup>.

A população de *M. incognita* foi anteriormente obtida no campo, propagada de progênies oriundas de uma massa de ovos,

mantida e multiplicada em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) e em seguida em plantas de pimentão (*Capsicum annuum* L.) em vasos com solo autoclavado. O inóculo foi obtido segundo a metodologia descrita por Hussey e Barker (1973) para extração de ovos, a partir das raízes parasitadas de plantas de pimentão. Os meloeiros foram inoculados com 12.000 ovos planta<sup>-1</sup>, três dias depois da inoculação da bactéria, quando também as plantas foram submetidas ao estresse hídrico. As inoculações foram efetuadas com pipetas de graduação automática, sendo a suspensão de ovos vertida em orifícios efetuados ao redor da planta.

A colheita foi realizada 58 dias após a semeadura e 45 dias após a inoculação do nematoide, sendo avaliados: crescimento morfológico da planta (comprimento da haste, diâmetro da haste, número de folhas e número de flores), biomassa fresca (raízes, folhas, hastes e total) biomassa seca (folhas, hastes e total) e índice de área foliar e, do nematoide, número de galhas nas raízes, número de ovos do nematoide por planta e o fator de reprodução. O comprimento da haste foi medido com trena, e o diâmetro, com paquímetro. Para determinação do índice de área foliar, imediatamente após a colheita, as folhas foram digitalizadas com auxílio de um scanner e o cálculo realizado utilizando o programa ImageJ (National Institute of Health, USA). Em seguida, a parte aérea das plantas foi colocada em sacos de papel e levados a estufa, a 65 °C com circulação de ar forçada, para secagem até peso constante.

Após a secagem as amostras foram moídas e acondicionadas em sacos de polietileno até a realização dos procedimentos para as análises de fósforo (P) pelo método de Miyazawa et al. (1984) e de nitrogênio (N) seguindo a metodologia descrita pela Association of Official Analytical Chemists – AOAC (1990).

Para os dados nematológicos o sistema radicular foi cuidadosamente removido de modo a minimizar as perdas de massa de ovos. A matéria fresca das raízes foi determinada, e com o auxílio de uma lupa foi realizada a contagem das galhas (TAYLOR; SASSER, 1978). Em seguida, as raízes foram cortadas em

pequenos segmentos para a extração dos ovos, conforme Hussey e Barker (1973). Com esses dados o fator de reprodução (FR) foi calculado pela relação, demonstrado na equação abaixo:

$$FR = \frac{\text{População final}}{\text{População inicial}}$$

Para as análises bioquímicas, foi utilizada a 3ª folha de cada planta que depois de retirada foi submergida em nitrogênio líquido e armazenada em freezer até o processamento. O extrato das amostras foi preparado pela homogeneização de 0,1 g de matéria fresca em 4 mL do tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 6,5) adicionado de 0,05 g de polivinilpirrolidona (PVP). O homogenato foi centrifugado a 10.000 rpm a 4 °C por 10 minutos (ZERAİK et al., 2008) e realizada análise das enzimas: catalase (BERRS; SIZER, 1952), ascarbato peroxidase (NAKANO; ASADA, 1981), polifenoloxidase (KAR; MISHRA, 1976), peroxidase (FATIBELHO-FILHO; VIEIRA, 2002), e da proteínas solúveis totais (BRADFORD, 1976). Para

análise do aminoácido prolina foi preparado um extrato utilizando 0,1 g de matéria fresca em 5 mL de ácido sulfosalicílico a 3%. O homogenato foi centrifugado por 10 minutos a 2.000 g e filtrado em papel de filtro nº 2 e determinados os teores de prolina (BATES et al., 1973).

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

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve interação entre estresse hídrico, *Bacillus* sp. e *M. incognita* para as variáveis de crescimento avaliadas. No entanto, interações significativas foram detectadas entre estresse hídrico e *Bacillus* sp. em relação à biomassa fresca da raiz e biomassa seca total e, entre *Bacillus* sp. e *M. incognita*, em relação ao número de galhas (Tabelas 1 e 2).

**Tabela 1.** Resumo da análise de variância das variáveis: comprimento da haste (CH), diâmetro da haste (DH), número de folhas (NF), número de flores (NFL), índice de área foliar (IAF), número de ovos do nematoide (OVOS) e número de galhas (NG) de mudas de meloeiro amarelo cultivar Gold Mine inoculadas com *Bacillus* sp. (B) e *Meloidogyne incognita* (N), submetidas a estresse hídrico (E) (50% CP por 45 dias) em casa de vegetação

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios						
		CH	DH	NF	NFL	IAF	OVOS	NG
E	1	14203,45*	0,00001 <sup>ns</sup>	19,14*	7,11 <sup>ns</sup>	0,26*	0,22 <sup>ns</sup>	0,24 <sup>ns</sup>
N	1	411,37*	0,002 <sup>ns</sup>	0,02*	2,99*	0,01 <sup>ns</sup>	277,63 <sup>ns</sup>	32,51 <sup>ns</sup>
B	1	10967,11 <sup>ns</sup>	0,001 <sup>ns</sup>	11,52 <sup>ns</sup>	2,11 <sup>ns</sup>	0,05 <sup>ns</sup>	0,15*	0,87*
E×N	1	140,97 <sup>ns</sup>	0,003 <sup>ns</sup>	0,19 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,001 <sup>ns</sup>	0,43 <sup>ns</sup>	0,31 <sup>ns</sup>
E×B	1	349,15 <sup>ns</sup>	0,0004 <sup>ns</sup>	0,28 <sup>ns</sup>	0,16 <sup>ns</sup>	0,17 <sup>ns</sup>	0,28 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>
N×B	1	282,62 <sup>ns</sup>	0,001 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>	0,13 <sup>ns</sup>	0,13 <sup>ns</sup>	0,08*
E×B×N	1	7,79 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,1 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,25 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>
Resíduo	56	513,11	0,003	0,48	1,78	0,02	0,26	0,09
CV (%)	-	23,01	13,09	14,82	28,99	5,75	25,42	38,85

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

**Tabela 2.** Resumo da análise de variância das variáveis: biomassa fresca das folhas (BFF), biomassa fresca da haste (BFH), biomassa fresca total (BFT), biomassa fresca da raiz (BFR), biomassa seca das folhas (BSF), biomassa seca da haste (BSH) e biomassa seca total (BST) de mudas de meloeiro amarelo cultivar Gold Mine inoculadas com *Bacillus* sp. (B) e *Meloidogyne incognita* (N), submetidas a estresse hídrico (E) (50% CP por 45 dias) em casa de vegetação

Fonte de	GL	Quadrados Médios
----------	----	------------------

COMPONENTES BIOQUÍMICOS E CRESCIMENTO DE MELOEIRO SOB ESTRESSE HÍDRICO ASSOCIADO À *MELOIDOGYNE INCOGNITA* E *BACILLUS* SPP.

Varição		BFF	BFH	BFT	BFR	BSF	BSH	BST
E	1	1,08*	685,39*	10,96*	0,26*	0,13*	1,01*	1,17*
N	1	0,06 <sup>ns</sup>	21,84*	0,33*	1,75 <sup>ns</sup>	0,004 <sup>ns</sup>	0,02*	0,02 <sup>ns</sup>
B	1	0,86 <sup>ns</sup>	204,32 <sup>ns</sup>	4,63 <sup>ns</sup>	0,52 <sup>ns</sup>	0,03 <sup>ns</sup>	0,48 <sup>ns</sup>	0,49*
E × N	1	0,001 <sup>ns</sup>	0,12 <sup>ns</sup>	0,000004 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,0001 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>
E × B	1	0,07 <sup>ns</sup>	29,03 <sup>ns</sup>	5,37 <sup>ns</sup>	0,27*	0,28 <sup>ns</sup>	0,0003 <sup>ns</sup>	0,17*
N × B	1	1,74 <sup>ns</sup>	27,59 <sup>ns</sup>	1,94 <sup>ns</sup>	0,06 <sup>ns</sup>	0,09 <sup>ns</sup>	0,003 <sup>ns</sup>	0,07 <sup>ns</sup>
E × B × N	1	0,002 <sup>ns</sup>	8,78 <sup>ns</sup>	0,18 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>	0,003 <sup>ns</sup>	0,002 <sup>ns</sup>	0,0001 <sup>ns</sup>
Resíduo	56	0,30	11,46	0,43	0,06	0,02	0,02	0,04
CV (%)	-	15,89	22,65	12,64	15,31	11,46	10,35	11,79

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

O estresse hídrico de 50% da capacidade do pote diminuiu significativamente ( $P \leq 0,05$ ) o comprimento da haste, o número de folhas, o índice de área foliar e as biomassas frescas e secas das plantas (Tabela 3).

**Tabela 3.** Efeito do estresse hídrico (50% CP) no comprimento da haste (CH), número de folhas (NF), índice de área foliar (IAF), biomassa fresca das folhas (BFF), biomassa fresca da haste (BFH), biomassa fresca total (BFT), biomassa seca das folhas (BSF) e biomassa seca da haste (BSH) de mudas de meloeiro amarelo cultivar Gold Mine, independentemente do estresse hídrico, da inoculação com a bactéria e o nematoide, durante 45 dias em casa de vegetação

Estresse hídrico	CH (cm)	NF (unid)	IAF (cm <sup>2</sup> )	BFF (g)	BFH (g)	BFT (g)	BSF (g)	BSH (g)
COM	86,09b	19,47b	345,12b	9,60b	13,03b	22,63b	0,86b	1,07b
SEM	107,69a	24,25a	454,80a	13,95a	16,40a	30,36a	1,22a	1,34a
DMS	13,60	3,77	68,74	2,02	2,06	3,82	0,19	0,21

As letras diferentes na coluna apresentam médias diferentes significativamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. COM – refere-se a 50% da capacidade do pote; SEM – refere-se a 100% da capacidade do pote.

Essa resposta foi atribuída ao mecanismo de regulação hídrica do meloeiro quando submetido aos baixos potenciais hídricos do solo e/ou à alta demanda evapotranspirativa, corroborado por Dias et al. (2006), Silva et al. (2008) e Silva et al. (2010). Isso pode ser explicado tendo em vista que o estresse abiótico pode afetar o desenvolvimento das plantas em todos os estádios de crescimento, de forma diferenciada, sendo mais sensíveis as plântulas emergentes, quando, possivelmente, o estresse interfere nas diversas funções da membrana, como a permeabilidade e o transporte de solutos, podendo causar alterações estruturais (ARAGÃO et al., 2009).

A redução da área foliar das plantas sob estresse hídrico pode ser um mecanismo de sobrevivência que permite a conservação de água (DIAS et al.; 2006)

Em relação ao nematoide, o parasitismo de *M. incognita* diminuiu, significativamente ( $P \leq 0,05$ ), o comprimento e biomassas fresca e seca da haste, a biomassa fresca total e o número de folhas e de flores (Tabela 4). É importante selecionar as melhores combinações para a dupla inoculação, que precisa ser estabelecida, com base na época e método de inoculação, planta hospedeira, isolado do patógeno e condições ambientais (LIU et al., 2012).

**Tabela 4.** Efeito do parasitismo de *Meloidogyne incognita* no comprimento da haste (CH), número de folhas (NF), número de flores (NFL), biomassa fresca da haste (BFH), biomassa fresca total (BFT) e biomassa seca da haste (BSH) do meloeiro amarelo cultivar Gold mine, independentemente do estresse hídrico e da inoculação com bactéria em casa de vegetação durante 45 dias

Nematoide	CH (cm)	NF	NFL	BFH (g)	BFT (g)	BSH (g)
-----------	---------	----	-----	---------	---------	---------

Com	83,65b	17,09b	1,50b	11,74b	22,76b	0,90b
Sem	110,13a	26,63a	3,63a	17,73a	30,22a	1,51a
DMS	13,60	3,77	0,84	2,06	3,82	0,21

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

A presença da bactéria afetou a reprodução do nematoide, reduzindo, significativamente ( $P \leq 0,05$ ), o número de ovos por planta, de 6.990 para 1.985 e a produção de galhas. Resultados semelhantes foram obtidos por Medeiros et al. (2009), ao estudarem rizobactérias do gênero *Bacillus*, para manejo de *M. incognita* raça 2, em meloeiro. Em tomateiro, a associação com *Bacillus* spp. contribuiu também para reduzir significativamente a reprodução de *M. incognita* representada pelo menor número de massas de ovos, de fêmeas, juvenis e também quando foram considerados todos os estádios de desenvolvimento do nematoide por grama de raiz (LIU et al., 2012). Ademais, Silva et al. (2010) relataram bom desenvolvimento na cultura do café (*Coffea canephora* Pierre) var. Conilon na presença de rizobactérias.

Todavia, é importante destacar que no presente estudo, na ausência de *Bacillus* sp., o meloeiro apresentou-se, moderadamente, resistente ao *M. incognita*. Bitencourt e Silva (2010) estudaram algumas olerícolas quanto à

hospedabilidade a *M. enterolobii*, e constataram que das 19 espécies avaliadas, 7 mostraram-se altamente favoráveis à multiplicação do nematoide, entre elas o meloeiro, com FR = 10,2. Contudo, a compatibilidade entre nematoide e planta hospedeira depende do cultivar, da espécie e raça do nematoide e de componentes bióticos e abióticos do ambiente.

Observa-se na Tabela 5 que as plantas inoculadas com *Bacillus* sp. e submetidas ao estresse hídrico, não apresentou diferença significativa em relação a biomassa fresca da raiz quando submetida sem estresse, independentemente do parasitismo de *M. incognita*, mas na ausência *Bacillus* sp., na mesma condição hídrica, houve redução significativa ( $P \leq 0,05$ ) da biomassa fresca do sistema radicular mostrando benefícios da associação bacteriana às plantas de melão Gold Mine, especialmente em condições de estresse. No entanto, considerando apenas o estresse hídrico, independentemente da presença do *Bacillus* sp. e do nematóide, a biomassa seca total foi reduzida.

**Tabela 5.** Efeito da interação entre *Bacillus* sp. e estresse hídrico (50% CP), na biomassa fresca da raiz (BFR) e biomassa seca total (BST) do meloeiro amarelo cultivar Gold Mine, independentemente da presença de *M. incognita*, em casa de vegetação urante 45 dias

Estresse hídrico	BST (g)		BFR (g)	
	<i>Bacillus</i> sp.		<i>Bacillus</i> sp.	
	Com	Sem	Com	Sem
Com (50% CP)	1,95 bB	1,91 bB	2,28 aA	1,33 bB
Sem (100% CP)	2,85 aA	2,55 aA	2,31 aA	2,55 aA
DMS	0,51		0,59	

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

CP = capacidade do pote, segundo Souza et al. (2000).

Segundo Stroschein et al. (2011) as substâncias produzidas por essas bactérias são equivalentes ao ácido indolacético, hormônio de crescimento vegetal e a inoculação desses microorganismos pode acelerar o processo de germinação das sementes, estimular o crescimento das plântulas e das raízes, a

emissão de perfilhos, além de aumentar a absorção de nitrogênio. Além disso, a utilização dessas bactérias pode ser uma alternativa de prática de baixo custo, que, se forem bem manejadas, poderão aumentar a produção vegetal, diminuir a contaminação do ambiente e reduzir os custos de produção, contribuindo para a sustentabilidade da

COMPONENTES BIOQUÍMICOS E CRESCIMENTO DE MELOEIRO SOB ESTRESSE HÍDRICO ASSOCIADO À *MELOIDOGYNE INCOGNITA* E *BACILLUS* SPP.

agricultura, promovendo benefícios à rizosfera e desenvolvendo papel preponderante para o desenvolvimento tecnológico na agricultura sustentável (MICHERREEFF et al., 2005).

Observando a Tabela 6, não ocorreram interações significativas entre estresse hídrico, *Bacillus* sp. e *M. incognita* para as variáveis químicas avaliadas. No entanto, interações significativas foram detectadas entre *Bacillus* sp. e estresse hídrico e entre *Bacillus* sp. e *M. incognita* ambas em relação à proteína solúvel. Atividade das enzimas peroxidase,

polifenoloxidase, catalase e, teores de prolina, fósforo e nitrogênio não foram afetados pelo estresse hídrico, rizobactéria ou nematoide. Entretanto, a atividade da enzima ascorbato peroxidase foi significativamente ( $P \leq 0,05$ ) aumentada (de 110,17 para 149,37 Mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gMF<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) quando o meloeiro foi submetido ao estresse de 50% da capacidade de pote, indicando que a redução de água contribuiu para o aumento da concentração da enzima nas plantas do meloeiro podendo ser um indicativo de defesa contra o estresse abiótico aplicado.

**Tabela 6.** Resumo da análise de variância das variáveis químicas: peroxidase (POD), ascorbato peroxidase (APX), polifenoloxidase (PPO), proteína solúvel (PS), prolina (PRO), catalase (CAT), teor de fósforo (P) e teor de nitrogênio (N) em meloeiro amarelo cultivar Gold Mine inoculado com *Bacillus* sp. (R) e *Meloidogyne incognita* (N), submetido a estresse hídrico (E) (50% CP) em casa de vegetação durante 45 dias

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios							
		POD	APX	PPO	PS	PRO	CAT	P	N
E	1	3,18 <sup>ns</sup>	5,46*	0,13 <sup>ns</sup>	54,83*	0,02 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,68 <sup>ns</sup>
N	1	6,90 <sup>ns</sup>	0,15 <sup>ns</sup>	0,47 <sup>ns</sup>	31,36*	0,02 <sup>ns</sup>	0,002 <sup>ns</sup>	0,001 <sup>ns</sup>	0,001 <sup>ns</sup>
R	1	4,48 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>	10,98 <sup>ns</sup>	1,36*	0,01 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,27 <sup>ns</sup>	1,22 <sup>ns</sup>
E × N	1	1,36 <sup>ns</sup>	2,71 <sup>ns</sup>	2,49 <sup>ns</sup>	6,15 <sup>ns</sup>	0,11 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>
E × R	1	3,45 <sup>ns</sup>	1,15 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>	64,55*	0,01 <sup>ns</sup>	0,05 <sup>ns</sup>	0,03 <sup>ns</sup>	0,27 <sup>ns</sup>
N × R	1	1,79 <sup>ns</sup>	38,85 <sup>ns</sup>	4,29 <sup>ns</sup>	0,02*	0,01 <sup>ns</sup>	0,04 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,04 <sup>ns</sup>
E × R × N	1	0,61 <sup>ns</sup>	5,06 <sup>ns</sup>	0,29 <sup>ns</sup>	0,03 <sup>ns</sup>	0,03 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,44 <sup>ns</sup>	0,003 <sup>ns</sup>
Resíduo	56	2,41	4,60	0,96	0,01	0,01	0,02	0,07	0,08
CV (%)	-	12,92	19,18	11,15	12,83	13,85	12,23	8,04	10,45

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

É sabido que enzimas oxidativas, especialmente a peroxidase, são consideradas marcadoras de estresses (FERNANDES-GARCIA et al., 2004). Ao que parece, sob altas concentrações de compostos fenólicos, as enzimas que oxidam compostos fenólicos, como polifenoloxidase, são inibidas em folhas, sendo corroborado por Rivero et al. (2003), em estudo com tomateiros. No entanto, isso não ocorreu nas condições em que este trabalho foi desenvolvido. Resultados semelhantes ao desta pesquisa foram relatados por Boava (2008), que não encontrou alteração na enzima polifenoloxidase em clones de eucalipto infectados pelo fungo *Puccinia psidii*.

Considerando apenas o estresse hídrico, independentemente dos demais fatores estudados, os níveis de ascorbato peroxidase aumentaram em torno de 35%.

Porém, nem sempre, sob estresse ocorre aumento de enzimas. Panda e Khan (2009) observaram redução na atividade da ascorbato peroxidase em raízes (mas não na parte aérea) de *Vigna radiata* sob estresse salino. Em diferentes culturas e sob diferentes níveis de estresse hídrico e salino, Vasconcelos et al. (2009) e Carneiro et al. (2011) verificaram que os níveis das enzimas oxidativas, principalmente catalase, ascorbato peroxidase e peroxidase não foram alterados com a aplicação dos estresses.

As plantas de meloeiro inoculadas com *Bacillus* sp. mantiveram os níveis de proteína solúvel constante, na presença do nematoide ou do estresse hídrico. Contudo, sem a rizobactéria os níveis de proteína solúvel aumentaram significativamente ( $P \leq 0,05$ ) com o estresse hídrico (Tabela 7).

**Tabela 7.** Valores médios da proteína solúvel da interação *Bacillus* sp. × estresse hídrico (50% CP) e *Bacillus* sp. × *Meloidogyne incognita* em meloeiro amarelo, cv. Gold Mine em casa de vegetação durante 45 dias

<i>Bacillus</i> sp.	Proteína solúvel (mg PS gMF <sup>-1</sup> )			
	Estresse hídrico		<i>M. incognita</i>	
	Com (50% CP)	Sem (100% CP)	Com	Sem
Com	13,39bA	14,37aA	13,31aA	13,20bA
Sem	16,94aA	13,56aB	14,45aB	17,30aA
DMS	1,93			

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

CP = capacidade do pote, segundo Souza et al. (2000).

De acordo com Santos et al. (2010) os teores de proteína solúvel e carboidratos aumentam porque o estresse hídrico pode alterar o potencial osmótico da célula para evitar a perda de água para o meio, conforme foi observado por esses autores quando seis genótipos de feijoeiro caupi foram submetidos a estresse hídrico.

Na interação *Bacillus* sp. × estresse hídrico foi observado que na ausência de *Bacillus* sp. e com estresse hídrico (50% CP) houve aumento da proteína solúvel total e nas mesmas condições a proteína total foi mais elevada do que nas plantas sem estresse (100% CP) e sem a presença da bactéria. Na interação *M. incognita* × *Bacillus* sp. verificou-se que a bactéria não interferiu no teor da proteína nas plantas inoculadas ou não com *M. incognita* e na ausência dos dois organismos os valores da proteína foram mais elevados tanto em relação à presença da bactéria quanto em relação à presença do nematóide, independentemente da condição hídrica (Tabela 7). Segundo Missiura (2005), os testes bioquímicos são pouco utilizados no estudo da interação patógeno × hospedeiro, sendo, entretanto, constituídos de métodos rápidos, seguros e de baixo custo que merecem maior atenção por parte dos pesquisadores de maneira geral.

Alguns estudos bioquímicos envolvendo proteínas solúveis e enzimas oxidativas têm demonstrado uma grande importância no manejo de culturas submetidas a estresses bióticos e abióticos. Segundo Sbalcheiro (2006), a interação planta × patógeno envolve mecanismos bioquímicos de defesa da planta contra o patógeno, os quais

são regidos por genes específicos. Estas enzimas agem como armas químicas de defesa contra o ataque de patógenos, além de algumas catalisarem a formação de barreiras físicas nas plantas, reforçando a importância de estudos da ativação enzimática no mecanismo das interações patógeno × hospedeiro.

## CONCLUSÕES

O estresse hídrico de 50% da capacidade do pote reduziu o crescimento vegetativo do meloeiro cultivar Gold Mine, especialmente na presença de *M. incognita*, afetando a fase reprodutiva e a produção de biomassa da planta.

Os níveis de ascorbato peroxidase na parte aérea foram aumentados pelo estresse hídrico, mas não por *M. incognita* ou *Bacillus* sp. As atividades de peroxidase, polifenoloxidase, catalase, e os teores de prolina, fósforo e nitrogênio não foram afetados pelo estresse hídrico, rizobactéria ou nematóide.

## AGRADECIMENTOS

A FACEPE pelo apoio financeiro a pesquisa.

## LITERATURA CITADA

ARAGÃO, C. A., SANTOS, J. S., QUEIROZ, S. O. P.; FRANÇA, B. Avaliação de cultivares de melão sob condições de estresse salino. *Revista Caatinga*, v. 22, p. 161-169, 2009.



COMPONENTES BIOQUÍMICOS E CRESCIMENTO DE MELOEIRO SOB ESTRESSE HÍDRICO ASSOCIADO À *MELOIDOGYNE INCOGNITA* E *BACILLUS* SPP.

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official Methods of Analysis**. 1990. In: EUA. 15 ed., Washington: D. C., 1117p.
- BATES, L. S., WALTREN, R. B.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water – stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973.
- BERNARDO, J. T., FREITAS, L. G. de, YAMADA, J. K., ALMEIDA, V. S., DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FERRAZ, S. Efeitos de adubos orgânicos sobre *Meloidogyne javanica* em tomateiro. **Nematologia Brasileira**, v. 35, n. 11, p. 10-19, 2011.
- BERRS, L. S. J.; SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 195, p. 133-140, 1952.
- BITENCOURT, N. V.; SILVA, G. S. Reprodução de *Meloidogyne enterolobii* em olerícolas. **Nematologia Brasileira**, v. 34, n. 3, p. 181-183, 2010.
- BOAVA, L. P. 2008. **Ação de indutores bióticos e abióticos no controle da ferrugem do eucalipto, atividade enzimática e expressão gênica durante o processo de infecção**. (Tese de Doutorado), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu SP, 2008. 181p.
- BRANDFORD, M. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.
- CARNEIRO, M. M. L. C., DEUNER, S., OLIVEIRA, P. V. de, TEXEIRA, S. B., SOUSA, C. P., BACARIN, M. A.; MORAES, D. M. de. Atividade antioxidante e viabilidade em sementes de girassol após estresse hídrico e salino. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 4, p. 754-763, 2011.
- DE VAY, J. E.; SCHNATHORST, W. C. Single-cell isolation and preservation of bacterial cultures. **Nature**, v. 199, p. 775-777, 1963.
- DIAS, N. da S., DUARTE, S. N., MEDEIROS, J. F. de; TELES FILHO, J. F. Salinidade e manejo da fertirrigação em ambiente protegido. I: Efeito sobre o crescimento do meloeiro. **Irriga**, v. 11, n. 2, p. 208-218, 2006.
- FATIBELHO-FILHO, O.; VIEIRA, I.C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 455-464, 2002.
- FERNÁNDEZ-GARCÍA, N., CARVAJAL, M.; OLMOS, E. Graft union formation in tomato plants: peroxidase e catalase involvement. **Annals of Botany**, v. 93, p. 53-60, 2004.
- FREITAS, S. S.; AGUILAR VILDOSO, C. I. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 987-994, 2004.
- FREITAS, L.G., NEVES, W. S., FABRY, C. F. S., MARRA, B. M., COUTINHO, M. M., ROMEIRO, R. S.; FERRAZ, S. Isolamento e seleção de rizobactérias para controle de nematóides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.) na cultura do tomateiro. **Nematologia Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 215-220, 2005.
- HAAS, D.; DÉFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 307-319, 2005.
- HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods of collecting inocula for *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v. 57, n. 12, p. 1025-1028, 1973.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v.57, p. 315 – 319, 1976.

- LIU, R., DAI, M., WU, X., LI, M.; LIU, X. Suppression of the root-knot nematode [*Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood] on tomato by dual inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria. **Mycorrhiza**, v. 22, p. 289-296, 2012.
- MEDEIROS, J. E., SILVEIRA, E. B., MARIANO, R. L. R.; PEDROSA, E. M. R. Inconsistency of the biological control of *Meloidogyne incognita* race 2 in melon by endophytic and rhizosphere bacteria. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 319-324, 2009.
- MICHEREEFF, S. J., ANDRADE, D. E. G. T.; MENESES, M. (ed.). 2005. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE, 2005. 388p.
- MISSIURA, F. B. 2005. **Alterações metabólicas promovidas pelo *Papaya Ringspot virus* – type W em plantas de melancia**. (Dissertação de Mestrado), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo RS, 2005. 69p.
- MIYAZAWA, M., PAVAN, M. A.; BLOCH, M. F. M. Avaliação de métodos com e sem digestão para extração de elementos em tecidos de plantas. **Ciência e Cultura**, v. 36, p. 1953-1958, 1984.
- NAKANO, Y. & ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, p. 867–880, 1981.
- PANDA, S. K. & KHAN, M. H. Growth, oxidative damage and antioxidant responses in greengram (*Vigna radiata* L.) under short-term salinity stress and its recovery. **Journal of Agronomy & Crop Science**, v. 195, p. 442-454, 2009.
- RAMAMOORTHY, V., VISWANATHAN, R., RAGUCHANDER, T., PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v. 20, p. 1-11, 2001.
- RIVERO, R. M., RUIZ, J. M., SÁNCHEZ, E.; ROMERO, L. Does grafting provide tomato plants an advantage against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production under condition of thermal shock? **Physiologia Plantarum**, v. 117, p. 44-50, 2003.
- SANTOS, C. F., LIMA, G. P. P.; MORGADO, L. B. Tolerância e caracterização bioquímica em feijão caupi submetido a estresse hídrico na pré-floração. **Naturalia**, v. 33, p. 34-44, 2010.
- SBALCHEIRO, C. C. 2006. **Ação do biocontrolador com atividade de indução de resistência no controle do crescimento bacteriano comum do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. (Dissertação de Mestrado), Universidade Passo Fundo, Passo Fundo RS, 2006. 124p.
- SCHAAD, N. W., JONES, J. B.; CHUM, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 3 ed., 373p. 2001.
- SILVA, V. A., ANTUNES, W. C., GUIMARÃES, B. L. S., PAIVA, R. M. C., SILVA, V. F., FERRÃO, M. A. G., DAMATTA, F. M.; LOUREIRO, M. E. Resposta fisiológica de clone de café Conilon sensível à deficiência hídrica enxertado em porta-enxerto tolerante. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 5, p. 457-464, 2010.
- SILVA, M. O., FREIRE, M. B. G. S., MENDES, A. M. S., FREIRE, F. J., SOUSA, C. E. S.; GÓES, G. B. Crescimento de meloeiro e acúmulo de nutrientes na planta sob irrigação com águas salinas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, n. 6, p. 593-605, 2008.
- SOUZA, C. C., OLIVEIRA, F. A., SILVA, I. F.; AMORIM NETO, M. S. Avaliação de métodos de determinação de água disponível e manejo da irrigação em terra roxa sob cultivo de algodoeiro herbáceo. **Revista Brasileira de**

COMPONENTES BIOQUÍMICOS E CRESCIMENTO DE MELOEIRO SOB ESTRESSE HÍDRICO ASSOCIADO À *MELOIDOGYNE INCOGNITA* E *BACILLUS* SPP.

**Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 4, n. 3, p. 338-342, 2000.

STEFFEN, R. B. 2007. **Caracterização, controle alternativo e reprodução de *Meloidogyne graminicola* em cultivares de arroz irrigado submetidos a diferentes regimes de umidade.** (Dissertação de Mestrado), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria RS. 2007. 96p.

STROCHEIN, M. R. D., SÁ, E. L. S. de, MACHADO, R. G., BRUXEL, T. de L. C. M., GIONGO, A.; DA FONTOURA, R. C. Caracterização e influência de rizóbios isolados de alfafa na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas em arroz. **Ciência Rural**, v. 41, n. 10, p. 1738-1743, 2011.

TAYLOR, A. L.; SASSER, J. N. **Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species).** Raleigh:

North Carolina State University, 1978. 111 p.

VASCONCELOS, A. C. F. de, ZANG, X., ERVIN, E. H.; KEIHL, J. de C. Enzymatic antioxidant responses to biostimulants in maize and soybean subjected to drought. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 3, p. 395-402, 2009.

XIAO, T. J., CHEN, F., GAO, C., ZHAO, Q. Y., SHEN, Q. R.; RAN, W. *Bacillus cereus* X5 enhanced bio-organic fertilizers effectively control root-knot nematodes (*Meloidogyne* sp.). **Pedosphere**. v. 23, n. 2, p. 160-168, 2013.

ZERAIK, A. E., SOUZA, F. S., FATIBELHO-FILHO, O.; LEITE, O. D. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**, v. 31, p. 731-734, 2008.