

Isolamento e quantificação de microesclerócios de *Macrophomina phaseolina* e análise da atividade microbiana no solo em diferentes sistemas de manejo

DIAS, L. A. F¹; BRIZOLA, D. C¹; SILVA, J. A¹; OLIVEIRA, M. C. N²; JUNIOR, A. O²; ALMEIDA, A. M. R².,

¹ Universidade Norte do Paraná, ²Embrapa Soja, Londrina, Paraná, e-mail: alvaro.almeida@embrapa.br

Introdução

A podridão de carvão das raízes, causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina* Tassi (1901), é capaz de infectar centenas de espécies vegetais como, milho, sorgo, amendoim, algodão e girassol, sendo comum em áreas cultivadas com soja (*Glycine Max L.*). Estudos realizados pela Embrapa Soja, mostram que este fungo é natural dos solos de mata nativa. Normalmente, aparece em reboleiras, de diversos tamanhos (ALMEIDA et al.,2001). Nos tecidos infectados são produzidos microesclerócios em grande quantidade, os quais são estruturas de resistência do fungo. São facilmente encontrados sob a epiderme das raízes ou na camada externa do córtex e na região do colo. Com a decomposição dos tecidos, os microesclerócios são liberados no solo, entrando em contato com as raízes das plantas,

germinando e infectando essas raízes. Nem todos germinam na mesma época podendo infectar as plantas em vários estádios diferentes. A incidência e a severidade de *M. phaseolina*, normalmente, tem sido associado à déficit hídrico e temperatura do solo. Baixo potencial hídrico e altas temperaturas aumentam a suscetibilidade das plantas. Os sintomas variam de acordo com a idade da planta. Durante a emergência, causam lesões de coloração marrom-escura na região do colo. As folhas tornam-se murchas permanecendo aderidas ao longo das hastes (principal característica), tornando-se secas e de coloração marrom-escura. As raízes apresentam a epiderme que se solta facilmente, deixando à mostra pontuações negras, que são os microesclerócios. O sistema de rotação de culturas é uma medida inviável para o controle dessa doença, por ela ter centenas de plantas hospedeiras (SHORT et al., 1980).

Considerou-se que um solo, cuja atividade microbiana fosse alta, tivesse efeito na redução da podridão de carvão. Fungos, bactérias e actinobactérias atuam no processo de decomposição da matéria orgânica do solo e na liberação de nutrientes lábeis para os colóides do solo. Assim, a avaliação da atividade microbiana tem sido proposta como um indicador sensível do aumento ou diminuição do teor e da qualidade da matéria orgânica do solo, e no monitoramento de alterações ambientais decorrentes do uso agrícola, como o sistema de semeadura convencional. Diferentes métodos podem ser usados para medição da atividade microbiana. Um método simples e rápido é o descrito por ADAM e DUNCAN, (2001) que mede a atividade microbiana do solo pela hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA). Segundo COSTA et al. (2000), o FDA é hidrolisado por várias enzimas (lípsases, proteases e esterases), presentes nos microrganismos e vem sendo usado para avaliar a atividade microbiana do solo.

Este trabalho teve como objetivo quantificar microesclerócios (colônias) de *M. phaseolina* e determinar a atividade microbiana de amostras de solo coletadas durante o verão em diferentes sistemas de manejo.

Material e métodos

As amostras foram coletadas na Fazenda Experimental da Coamo, Campo Mourão/PR, em 8 tratamentos diferentes. As práticas de manejo químico e biológico adotado (adubação, calagem e inoculação com *Bradyrhizobium*) foram as mesmas para todas as áreas. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com três repetições. As análises de variâncias foram realizadas atendendo aos testes de normalidade e independência dos erros, homogeneidade de variâncias e não-aditividade do modelo.

Os tratamentos consistiram em sistema de semeadura convencional (SSC), além de sistema plantio direto (SPD), tabela 1.

As coletas foram realizadas por meio de trado, retirando-se o solo com auxílio de uma espátula na profundidade de 0-10 cm. As amostras foram homogeneizadas, obtendo-se amostras compostas acondicionadas em sacos plásticos, devidamente identificadas, que foram armazenadas em câmara fria e iniciando-se a avaliação no dia seguinte. A determinação da umidade das amostras foi efetuada pelo método de gravimetria, secando em estufa 10 g de solo de cada amostra a 104°C por 24h. Para o peneiramento das amostras foi utilizado malha de abertura 2,0 mm. Antes deste processo, as amostras foram expostas ao ar, em temperatura ambiente, por uma hora.

O meio de cultura utilizado para *M. phaseolina* foi BDA com adição de 0,01% de rosa de bengala e posteriormente esterilizado. Foram pesadas 5 g de solo por amostra, em backers, devidamente etiquetados. Procedeu-se à lavagem das amostras de solo com solução 0,6% de hipoclorito de sódio por 5 minutos. Após isso o resíduo foi peneirado em peneiras de 297 μm , coletando-se micropartículas do solo que ficavam retidos na peneira de 45 μm , devolvendo-se ao backer utilizando uma piseta com água destilada e completando com 20 mL.

Os meios retirados da autoclave foram mantidos em banho-maria a 60°C. Foi adicionado 1,28 mL de estreptomicina/cloroneb a 1% e a

mistura de 5 g solo em 20 mL de água destilada, totalizando 100 mL. Estes foram homogeneizados e distribuindo posteriormente em 5 placas a cada 100 mL de meio.

Estas placas foram incubadas por 10 dias à temperatura de 28°C fazendo-se a avaliação do número de colônias. A quantificação dos resultados considerou a contagem de 15 placas por amostra.

A atividade microbiana foi determinada pelo método de hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) descrito por SCHUNER e ROSSWALL et al. (1982) e adaptado por COSTA et al. (2000). A solução stock FDA foi incubada (banho-maria) a 100°C por 1 hora, e resfriado até o início das análises.

Para análise, foram colocadas 5 g de solo de cada amostra, em erlenmeyers com capacidade de 250 mL, nos quais foram adicionados 20 mL de solução tampão fosfato de potássio e 200 μ L de solução stock de FDA (0,2%), sendo transferidos para o agitador orbital por 20 minutos a 160 rpm. Após esse processo, foi adicionado 20 mL de acetona por amostra para paralisar a reação de hidrólise. A suspensão foi filtrada em filtro Watman 1 durante 10 minutos e, em seguida, realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (modelo Gênese 10uv), no comprimento de onda de 490 nm, para a determinação da quantidade de fluoresceína hidrolisada.

Foi elaborada uma curva padrão nas concentrações de 0, 100, 200, 300 e 400 μ g de FDA já hidrolisado. Neste processo 5 g de solo de cada amostra foi colocado em erlenmeyer, no qual foi adicionado 15 mL de solução tampão fosfato de potássio e 5 mL de cada curva padrão, de acordo com cada concentração. Após isso, cada erlenmeyer foi transferido para o agitador orbital por 20 minutos a 160rpm. Foi adicionado 20 mL de acetona por amostra e realizada a filtragem durante 10 minutos. A leitura da absorbância em espectrofotômetro foi feita imediatamente após a filtragem para evitar a evaporação da acetona, no comprimento de onda de 490 nm.

Resultados e discussão

As avaliações de atividade microbiana, utilizando FDA, devem sempre considerar o histórico das sequências das culturas em rotação (milho e soja) e sucessão (trigo, aveia, tremoço, nabo forrageiro, ervilhaca forrageira), tabela 2. De igual forma, a contagem de colônias da *M. phaseolina*, tabela 3.

A atividade microbiana, medida por hidrólise de diacetato de fluoresceína - FDA, foi significativamente igual aos tratamentos T3, T4, T6 e T8. A pior atividade foi medida no tratamento convencional com soja no verão e trigo no inverno. Os demais tratamentos apresentaram valores intermediários.

Com relação à concentração de propágulos de *M. phaseolina*, o tratamento com menor contagem de propágulos, foi o tratamento convencional soja-aveia, utilizado por 10 anos nessa sequência. O tratamento com maior contagem de propágulos, foi o tratamento 3. Devido ao alto coeficiente de variação, 50%, estima-se que um fungo polífago e com distribuição irregular no solo, tenha sua avaliação afetada pela amostragem.

Conclusão

As avaliações, embora anuais, devem sempre considerar o histórico das sequências das culturas da área de cultivo;

As maiores atividades microbiana, com o uso do FDA, ocorreram nos tratamentos T3, T4, T6 e T8;

Tanto os tratamentos que mostraram os melhores índices atividade microbiana e os tratamentos com a menor atividade, não apresentaram efeito deletério sobre a concentração de microesclerócios de *M. phaseolina*.

Referências

ADAM, G.; DUNCAN, H. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, p. 943-951, 2001.

ALMEIDA, A. M. R.; SEIXAS, C. D. S.; FARIAS, J. R. B.; OLIVEIRA, M. C. N. de; FRANCHINI, J. C.; DEBIASI, H.; COSTA, J. M. da; GAUDÊNCIO, C. de A. **Macrophomina phaseolina em soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 55 p. (Embrapa Soja. Documentos, 346).

AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Ceres, 2011. v.1, 704 p.

COSTA, J. L. da S.; MENGE, J. A.; CASALE, W. L. Biological control of Phytophthora root rot of avocado with microorganisms grown in organic mulches. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 239-246, 2000.

GHINI, R.; BETTIOL, W. Método de hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) como indicador de atividade microbiana no solo e supressividade a *Rhizoctonia solani*. **Summa Phytopathologica**, v.24, n.3/4, p.239-242, 1998.

GODOI, L. C. L. **Propriedades microbiológicas de solos em áreas degradadas e recuperadas na região dos cerrados goianos**. 2001. 87f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. de S.; COLOZZI FILHO, A.; BALOTA, E. L.; SANTOS, J.C.F. dos Ecologia microbiana em solos sob cultivos na Região Sul do Brasil. In: SIMPOSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3.; REUNIAO DE LABORATORIOS PARA RECOMENDACAO DE ESTIRPES DE RHIZOBIUM E BRADYRHIZOBIUM, 6., 1994, Londrina. **Microbiologia do solo: desafios para o seculo XXI - anais**. Londrina: IAPAR/EMBRAPA-CNPSO, 1995. p.234-270.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Ceres, 2005. v.2, 663 p.

SHUNER, J.; ROSSWALL, T. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. **Applied and Environmental Microbiology**. v.43, p.1256-1261, 1982.

SILVA, M.; SIQUEIRA, E. R.; COSTA, J. L. S. Hidrólise de diacetato de fluoresceína como bioindicador da atividade microbiana de um solo submetido a reflorestamento. **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1493-1496, 2004.

Tabela 1. Relação dos diferentes tipos de rotação/sucessão, referentes a 4 anos de rotação. Fazenda Experimental da Coamo, Campo Mourão, 2015.

Tratamentos	Anos			
	2011 Verão/Inverno	2012 Verão/Inverno	2013 Verão/Inverno	2014 Verão/Inverno
T3	SOJA/MILHO-S	SOJA/TRIGO	MILHO/AVEIA	SOJA/MILHO-S-M
T4	SOJA/TRIGO	SOJA/TRIGO	MILHO/TREMOÇO	SOJA/AVEIA
T6	SOJA/TRIGO	SOJA/TRIGO	MILHO/ERVILHACA	SOJA/TRIGO
T8	SOJA/MILHO-S	SOJA/TRIGO	MILHO/ERVILHACA-F	MILHO/TREMOÇO
T9	SOJA/TRIGO	SOJA/MILHO-S	MILHO/AVEIA + NABO	SOJA/MILHO-S
T11	SOJA/TRIGO	SOJA/TRIGO	SOJA/TRIGO	SOJA/TRIGO
Conv-Trigo	SOJA/TRIGO	SOJA/TRIGO	SOJA/TRIGO	SOJA/TRIGO
Conv-Aveia	SOJA/AVEIA	SOJA/AVEIA	SOJA/AVEIA	SOJA/AVEIA

A descrições abreviadas acima são: S = safrinha, M = milho e F = forrageira.

Tabela 2. Efeito dos sistemas de rotação/sucessão de culturas, em semeadura direta e convencional, em relação a atividade microbiana utilizando método de hidrólise de diacetato de fluoresceína. Fazenda Experimental da Coamo; Campo Mourão, 2015.

Tratamentos	Atividade Microbiana (μg FDA hidrolisado/g solo seco/min)
T-4	4,99 a
T-6	4,76 a
T-8	4,76 a
T-3	4,53 a b
T-11	4,23 b c
T-9	4,05 b c
Conv-Aveia	3,95 b c
Conv-Trigo	3,31 c

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 3. Efeito dos sistemas de rotação/sucessão de culturas, em semeadura direta e convencional, na concentração de microescleródios de *Macrophomina phaseolina*. Fazenda Experimental da Coamo; Campo Mourão, 2015.

Tratamentos	<i>Macrophomina phaseolina</i> (microescleródios/g solo seco)
T-3	23,42 a
T-4	18,81 a b
T-6	12,29 a b
T-8	18,96 a b
T-9	13,27 a b
T-11	10,02 a b
Conv-Trigo	17,31 a b
Conv-Aveia	6,39 b

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).