

Método de hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) como indicador de atividade microbiana no solo e supressividade a *Rhizoctonia solani*

Raquel Ghini¹, Mara D. L. Mendes, Wagner Bettiol

Embrapa Meio Ambiente; CP 69; 13.820.000 - Jaguariúna/SP.

¹Bolsista do CNPq.

Aceito para publicação em: 20/08/98.

RESUMO

Ghini, R., Mendes, M.D.L., 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, p. 239-242, 1998.

O método de hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) foi comparado com a determinação da atividade respiratória (desprendimento de CO₂) e teor de matéria orgânica, como indicadores da supressividade do solo a *Rhizoctonia solani*. Para a avaliação da hidrólise de FDA, amostras de solo foram agitadas (200 rpm) por 20 min, juntamente com tampão fosfato de potássio e uma alíquota da solução estoque de FDA. A reação de hidrólise foi interrompida através da adição de acetona. A seguir, procedeu-

se a filtragem e, em espectrofotômetro, determinou-se a absorbância (490 nm) do filtrado; os dados de absorbância foram aplicados a uma curva padrão preestabelecida, para se determinar a concentração de FDA hidrolisado. A supressividade do solo a *R. solani* foi avaliada através do crescimento micelial do patógeno nas amostras de solo. Correlações positivas foram obtidas entre a taxa de hidrólise de FDA, desprendimento de CO₂, teor de matéria orgânica dos solos e a supressividade a *R. solani*.

Palavras-chave adicionais: biomassa, CO₂, matéria orgânica, patógenos de solo.

ABSTRACT

Ghini, R., Mendes, M.D.L., Bettiol, W. Rate of hydrolysis of fluorescein diacetate (FDA) as indicator of microbial activity and soil suppressiveness to *Rhizoctonia solani*. *Summa Phytopathologica*, v. 24, p. 239-242, 1998.

The method of fluorescein diacetate (FDA) hydrolysis was compared with the respiratory activity (determination of CO₂ evolution) and amount of organic matter, as indicator of soil suppressiveness to *Rhizoctonia solani*. For the evaluation of FDA hydrolysis, soil samples were shaken (200 rpm), during 20 min, mixed with potassium phosphate buffer and an aliquot of FDA stock solution. The reaction was halted by adding acetone. The

concentration of fluorescein was determined spectrophotometrically and by comparing absorbancies against a standard curve. The soil suppressiveness to *R. solani* was evaluated by the mycelial growth of the pathogen on soil samples. Positive correlations were observed between the amount of hydrolyzed FDA, CO₂ evolution, organic matter and suppressiveness to *R. solani*.

Additional Keyword: biomass, CO₂, organic matter, soilborne pathogens.

Solos supressivos são definidos como aqueles nos quais o desenvolvimento da doença é suprimido mesmo quando o patógeno é introduzido na presença do hospedeiro suscetível (2). A supressividade pode ser resultante de fatores bióticos ou abióticos, sendo diversos e complexos os mecanismos envolvidos. As interações microbianas em alguns solos podem naturalmente prevenir o estabelecimento de patógenos ou inibir as suas atividades patogênicas. Em numerosos casos, a supressividade está diretamente relacionada com a atividade microbiana do solo no período crítico do ciclo do patógeno, por exemplo, durante a germinação de propágulos e crescimento na rizosfera da planta hospedeira (15).

A atividade dos microrganismos é avaliada em termos

metabólicos, como por exemplo, através da avaliação da taxa de respiração (consumo de O₂ ou emissão de CO₂), produção de ATP, produção ou liberação de calor, biossíntese de macromoléculas, transformações específicas, consumo de substratos ou acúmulo de produtos, atividade enzimática total e específica, taxa de mineralização de N, P e S, dinâmica da matéria orgânica e do húmus, densidade populacional e biomassa, reações bioquímicas específicas ou observações microscópicas *in situ* (16).

O diacetato de fluoresceína (FDA) é hidrolisado por várias enzimas (lipase, protease e esterases) das células vivas e, por esse motivo, tem sido usado para avaliar a atividade microbiana nas amostras de solo. A fluoresceína permanece na célula causando fluorescência intracelular que pode ser visualizada por

microscopia de fluorescência ou quantificada por fluorometria ou espectrofotometria (3, 8).

CHEN et al. (4, 5) e INBAR et al. (8) encontraram alta correlação positiva entre a supressividade de substratos a *Pythium ultimum*, causador de tombamento de plântulas de pepino, e a atividade microbiana total, avaliada pela taxa de hidrólise de FDA. O método também foi usado com bons resultados por MANDELBAUM & HADAR (10), para avaliar o efeito de fontes de carbono na atividade microbiana e supressividade a *Pythium aphanidermatum* de substratos orgânicos.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o método de hidrólise de FDA como indicador de atividade microbiana e supressividade a *Rhizoctonia solani*, comparando-o com a atividade respiratória microbiana e o teor de matéria orgânica de solos.

MATERIAL E MÉTODOS

Trinta amostras de solo foram obtidas em diversos locais da microbacia do Córrego do Taquara Branca (Sumaré/SP). Em cada local, sete subamostras de solo de 8x8x8 cm³ foram retiradas aleatoriamente. A amostra composta pela mistura das subamostras foi homogeneizada, peneirada (4 mm) e submetida às avaliações microbiológicas, até 24 horas após a coleta.

Para a determinação da hidrólise de FDA, metodologia semelhante à descrita por BOEHM & HOITINK (3) foi utilizada. Amostras de 5 g de solo, em 5 repetições, foram colocadas em frascos de Erlenmeyer (250 mL), juntamente com 20 mL de tampão fosfato de potássio 60 mM (8,7 g de K₂HPO₄ e 1,3 g de KH₂PO₄/L de água destilada; pH 7,6). A reação de hidrólise de FDA (Sigma Chemical Co.) foi iniciada adicionando-se 0,2 mL (400 µg) de solução estoque de FDA (2 mg.mL⁻¹ acetona). As amostras foram incubadas por 20 min. em agitador (200 rpm) a 25°C. A reação foi interrompida através da adição de 20 mL de acetona por frasco. A seguir, procedeu-se a filtragem (Whatman n° 1), sendo os filtrados recolhidos em tubos de cultura, posteriormente tampados com papel alumínio e acondicionados em recipiente contendo gelo, para evitar a evaporação da acetona. Em espectrofotômetro, determinou-se a absorbância (490 nm) dos filtrados. A concentração de FDA hidrolisado (µg FDA hidrolisado/g solo seco) foi obtida através de uma curva padrão. A curva padrão foi obtida adicionando-se FDA, nas quantidades de 0, 100, 200, 300 e 400 µg, em 5 mL de tampão fosfato, contido em tubos de ensaio. Os tubos foram mantidos por 60 min. em água fervente, para hidrolisar o FDA. Após a hidrólise, o FDA foi então adicionado a Erlenmeyers contendo 5 g de solo e 15 mL de tampão fosfato, em 3 repetições. A seguir, metodologia semelhante à descrita anteriormente foi realizada para se obter a curva padrão entre o FDA hidrolisado e a absorbância.

Para a avaliação da respiração microbiana, as amostras de solo (200 g) foram incubadas em recipientes hermeticamente fechados (volume de 2,5 L), em 3 repetições, contendo 10 mL de KOH 0,5N, no escuro, a 25°C. Após 7, 14 e 21 dias de incubação, o KOH foi titulado com HCl, segundo o método descrito por GRISI (6), para a determinação da quantidade total de CO₂ desprendido.

O teor de matéria orgânica dos solos foi obtido através da determinação do C orgânico pelo método volumétrico pela digestão com dicromato de potássio e titulação pelo sulfato ferroso amoniacal (14).

Para o teste de supressividade, uma camada de solo foi colocada em placas de Petri (50 g/placa com 15 cm de diâmetro) e, a seguir,

verteu-se uma fina camada de ágar-água sobre o solo, em 3 repetições. Discos contendo micélio de *R. solani* (7 mm de diâmetro) foram transferidos para o centro das placas e a incubação foi realizada a 25°C, no escuro. A testemunha foi constituída pelo crescimento do fungo em placas de Petri contendo ágar-água. Diariamente, foram avaliados dois diâmetros perpendiculares da colônia de *R. solani*, com auxílio de microscópio estereoscópico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de regressão mostrou que o crescimento micelial de *R. solani* foi negativamente correlacionado com os dois métodos utilizados para avaliação da atividade microbiana (atividade respiratória e hidrólise de FDA) e com o teor de matéria orgânica dos solos (Fig. 1, 2 e 3). Os resultados comprovam a importância da microbiota do solo no controle natural do patógeno, como demonstrado por diversos autores (9, 12). POZZER & CARDOSO (13), estudando a supressividade de solos a *R. solani*, constataram que a supressividade era transmissível e reduzida com o tratamento térmico, sendo assim resultante da atividade microbiana do solo. MICHHEREFF et al. (11) também relacionaram a supressividade a *R. solani* à comunidade microbiana presente nos solos.

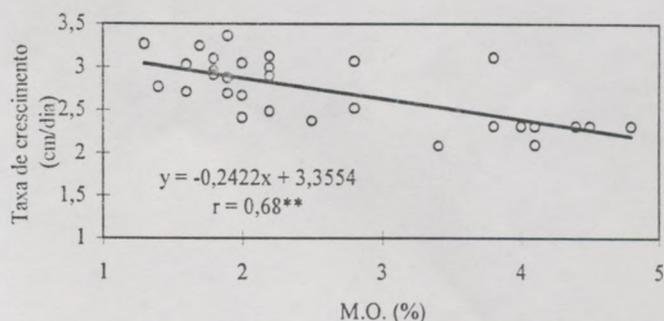


Figura 1 - Relação entre o teor de matéria orgânica (M. O.) e a taxa de crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*, nas amostras de solo. O coeficiente de correlação (r) é significativo a p = 0,01.

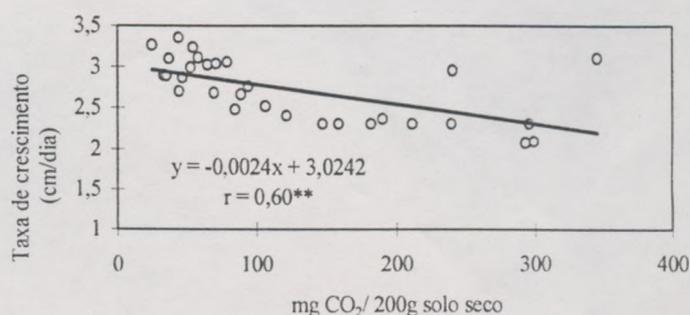


Figura 2 - Relação entre a atividade respiratória (mg CO₂/200 g solo seco) e a taxa de crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*, nas amostras de solo. O coeficiente de correlação (r) é significativo a p = 0,01.

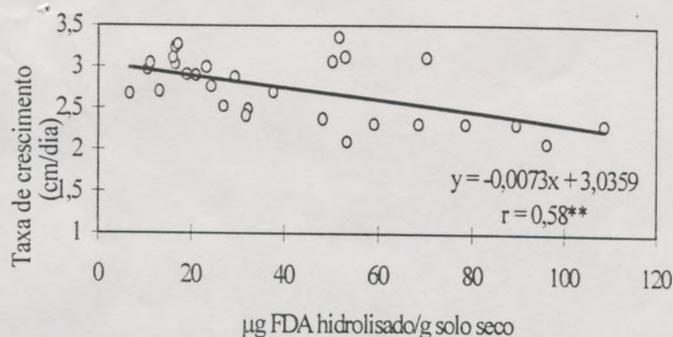


Figura 3 - Relação entre a hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) e a taxa de crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*, nas amostras de solo. O coeficiente de correlação (r) é significativo a $p = 0,01$.

A hidrólise de FDA apresentou correlação positiva, tanto com o teor de matéria orgânica, quanto com a respiração microbiana (Fig. 4 e 5). Esse resultado era esperado devido ao efeito da matéria orgânica na comunidade microbiana e da representatividade do desprendimento de gás carbônico pelos microrganismos.

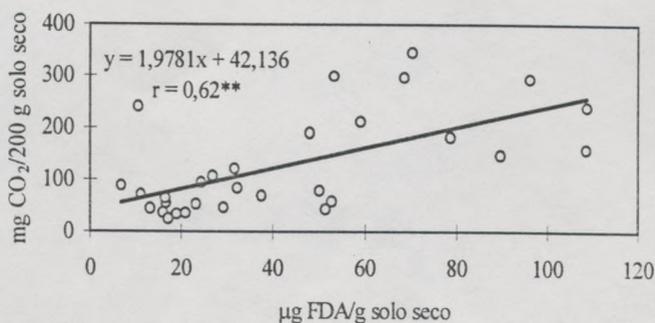


Figura 4 - Relação entre a hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) e a atividade respiratória ($\text{mg CO}_2/200 \text{ g solo seco}$), nas amostras de solo. O coeficiente de correlação (r) é significativo a $p = 0,01$.

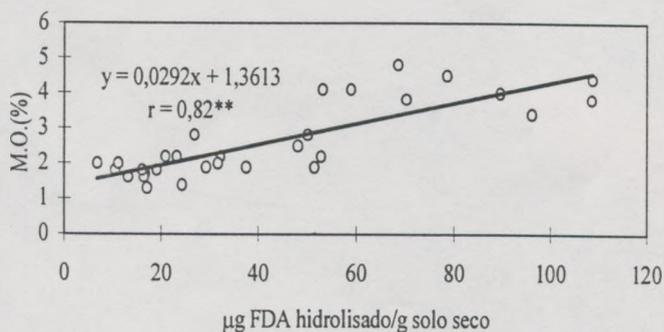


Figura 5 - Relação entre a hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) e o teor de matéria orgânica (M.O.), nas amostras de solo. O coeficiente de correlação (r) é significativo a $p = 0,01$.

Diversos trabalhos tentam isolar o papel de reconhecidos agentes de controle biológico na supressividade a patógenos (9, 12). Entretanto, essa metodologia, além de trabalhosa, não considera a comunidade microbiana total e sua atividade. Nessa comunidade estão presentes organismos que agem por antibiose, parasitismo, competição e indução de resistência do hospedeiro, sendo que muitos deles são desconhecidos por não serem facilmente isolados e cultivados em meio de cultura, haja vista que, segundo HERBERT (7), somente uma pequena fração da comunidade microbiana total pode ser cultivada em meio de cultura, sempre seletivo, não existindo um meio de cultura universal. Assim, os trabalhos ficam restritos a um limitado número de organismos, sendo reconhecido que, em condições naturais do solo, o importante é a somatória dos efeitos. Dessa forma, a determinação da atividade microbiana total é mais importante que a de poucos grupos, pois quanto maior essa atividade, maior será a competição entre os microrganismos. KWOK *et al.* (9), que trabalharam com diversos antagonistas em substratos orgânicos, concluíram que a supressividade a *R. solani* pode ser devida à atividade de uma variedade de antagonistas.

Semelhantemente aos resultados obtidos por CHEN *et al.* (4, 5) e INBAR *et al.* (8) em estudos com substratos orgânicos para *P. ultimum*, esse estudo mostra que a hidrólise de diacetato de fluoresceína pode ser utilizada para avaliar a supressividade a *R. solani*. O método de hidrólise de FDA apresentou as seguintes vantagens em relação à respiração microbiana, que também apresenta correlação com a supressividade de solos (1): boa correlação com a supressividade a *R. solani*; rapidez e facilidade de execução, baixo custo, pouca necessidade de mão de obra, materiais e equipamentos. Por outro lado, o método apresenta alguns problemas, como a possível hidrólise do FDA por enzimas extracelulares; as diferenças entre os organismos quanto ao tempo de absorção do FDA; a possível adsorção do FDA pela matéria orgânica do solo, entre outros (17).

Apesar da possibilidade da utilização da hidrólise de FDA para prever a supressividade a *R. solani*, sugere-se que essa determinação seja acompanhada de algum outro método para aumentar a confiabilidade nos resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALABOUVETTE, C., COUTEAUDIER, Y., LOUVET, J. Recherches sur la résistance des sols aux maladies XII. Activité respiratoire dans un sol résistant et un sol sensible aux fusarioses vasculaires enrichis en glucose. *Agronomie*, Paris, v. 5, p.69-72, 1985.
- BAKER, R., COOK, J. *Biological control of plant pathogens*, San Francisco: W.H. Freeman, 1974. 433p.
- BOEHM, M.J., HOITINK, H.A.J. Sustainance of microbial activity in potting mixes and its impact on severity of *Pythium* root rot of *Poinsettia*. *Phytopathology*, Saint Paul, v.82, n.3, p.259-264, 1992.
- CHEN, W., HOITINK, H.A.J., MADDEN, L. V. Microbial activity and biomass in container media for predicting suppressiveness to damping-off caused by *Pythium ultimum*. *Phytopathology*, Saint Paul, v.78, n.11, p.1447-1450, 1988.
- CHEN, W., HOITINK, H.A.J., FRITZ SCHMITTHERNNER, A., TUOVINEN, O.H. The role of microbial activity in suppression of damping-off caused by *Pythium ultimum*. *Phytopathology*, Saint Paul, v.78, n.3, p.314-322, 1988.
- GRISI, B.M. Método químico de medição da respiração edáfica:

- alguns aspectos técnicos. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v.30, n.1, p.82-88, 1978.
07. HERBERT, R.A. Methods for enumerating microorganisms and determining biomass in natural environments. In: GRIGOROVA, R., NORRIS, J.R. *Methods in microbiology, techniques in microbial ecology*. London: Academic Press, 1990, v. 22 p.1-39.
08. INBAR, Y., BOEHM, M.J., HOITINK, H.A.J. Hydrolysis of fluorescein diacetate in sphagnum peat container media for predicting suppressiveness to damping-off caused by *Pythium ultimum*. *Soil Biology & Biochemistry*, Exeter, v.23, p.479-483, 1991.
09. KWOK, O.C.H., FAHY, P.C., HOITINK, H.A.J., KUTER, G.A. Interactions between bacteria and *Trichoderma hamatum* in suppression of *Rhizoctonia* damping-off in bark compost media. *Phytopathology*, Saint Paul, v.77, p.1206-1212, 1987.
10. MANDELBAUM, R., HADAR, Y. Effects of available carbon source on microbial activity and suppression of *Pythium aphanidermatum* in compost and peat container media. *Phytopathology*, Saint Paul, v.80, n.9, p.794-804, 1990.
11. MICHEREFF FILHO, M., MICHEREFF, S.J., SILVA, E.B., ANDRADE, D.E.G.T., ANTUNES SOBRINHO, S., MARIANO, R.L.R. Influência de tipos de solo do estado de Pernambuco na intensidade de doença induzida por *Rhizoctonia solani* em feijoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.21, n.1, p.19-25, 1996.
12. NELSON, E.B., KUTER, G.A., HOITINK, H.A.J. Effects of fungal antagonists and compost age on suppression of *Rhizoctonia* damping-off in container media amended with composted hardwood bark. *Phytopathology*, Saint Paul, v.73, p.1457-1462, 1983.
13. POZZER, L., CARDOSO, J.E. Supressividade natural de um latossolo vermelho-escuro a *Rhizoctonia solani*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.15, n.3, p.206-210, 1990.
14. OLIVEIRA, L.B. *Manual de métodos de análise de solos*. Rio de Janeiro: EMBRAPA-SNLCs, 1979.
15. RODRÍGUEZ-KÁBANA, R., CALVET, C. Capacidad del suelo para controlar enfermedades de origen edafico. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.19, n.2, p.129-138, 1994.
16. SIQUEIRA, J. O., MOREIRA, F. M. de S., GRISI, B. M., HUNGRIA, M., ARAUJO, R. S. Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 1994. 142p. (Documentos, 45).
17. STOTZKY, G., BOLLAG, J. M. *Soil Biochemistry*. New York: Marcel Dekker, 1990. 565p.

Influência da temperatura de incubação no crescimento micelial, na esporulação e na patogenicidade de *Fusarium subglutinans*, agente causal da fusariose do abacaxizeiro

Luiz A.P. Martelleto¹, Alzimir M.C. Castilho², Antonio de Goes³

¹ PESAGRO-RIO, Est. Exp. de Macaé - C.P. 119371, 27.901-970, Macaé - RJ.

² UFRRJ, Rodovia BR 485, Km 7 (Antiga Estrada Rio - S.Paulo, Km 47), 23.851-970, Seropédica - RJ.

³ FCAV-UNESP, Depto. de Defesa Fitossanitária - Rodovia Carlos Tonanni Km 5, 14.870-000, Jaboticabal - SP.

Aceito para publicação em: 17/09/98.

RESUMO

Martelleto, L.A.P., Castilho, A.M.C., Goes, A. de. Influência da temperatura de incubação no crescimento micelial, na esporulação e na patogenicidade de *Fusarium subglutinans*, agente causal da fusariose do abacaxizeiro. *Summa Phytopathologica*, v. 24, p. 242-246, 1998.

Sob condições de laboratório, avaliou-se o crescimento micelial, a esporulação e a patogenicidade de *F. subglutinans*, inoculado na base de folhas destacadas de plantas de abacaxi 'Pérola', seguido de incubação em diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25 e 30°C ± 2°C). Além dessas temperaturas, no caso específico da esporulação, avaliou-se também o efeito da temperatura de 35°C. O crescimento micelial foi determinado mediante leituras diárias do crescimento radial do fungo, até o 6º dia de incubação, quando avaliou-se a influência da temperatura no número de conídios produzidos. A

patogenicidade foi determinada medindo-se, a cada dois dias, o tamanho das lesões a partir dos pontos inoculados. Verificou-se que houve crescimento micelial do fungo na faixa de 10 a 30°C, sendo 25°C a temperatura considerada ótima para o desenvolvimento micelial. Quanto à esporulação, esta ocorreu entre 15 e 35°C e mostrou-se diretamente proporcional ao aumento da temperatura. Em relação à patogenicidade, verificou-se, sistematicamente, a formação e expansão das lesões no tecido foliar entre 10 e 30°C, sendo, no entanto, mais expressiva na faixa entre 15 a 25°C.

Palavras-chave adicionais: *Ananas comosus*, abacaxi.