

## Potencial de Biocontrole de *Rhizoctonia solani* do Feijão-Caupi

Iêda Alana Leite de Sousa<sup>1\*</sup>, Ruth Linda Benchimol<sup>2</sup>, Carina Melo da Silva<sup>3</sup>, Ana Karoliny Alves Santos<sup>4</sup>, Cássia Cristina Chaves Pinheiro<sup>4</sup>, Eudes de Arruda Carvalho<sup>5</sup>

1. Acadêmica de Engenharia Florestal (Universidade Federal Rural da Amazônia, Brasil).

2. Engenharia Agrônoma (Faculdade de Ciências Agrárias do Pará). Doutora em Ciências Biológicas (Universidade Federal do Pará). Pesquisadora da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasil.

3. Agrônoma e Doutora em Agronomia (Universidade Federal Rural da Amazônia, Brasil).

4. Acadêmica de Agronomia (Universidade Federal Rural da Amazônia, Brasil).

5. Engenheiro Agrônomo e Doutor em Fitopatologia (Universidade Federal de Lavras). Pesquisador A da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Quarentena Vegetal, Brasil.

\*Autor para correspondência: ialanaleites@gmail.com

### RESUMO

O objetivo foi avaliar o potencial de nove isolados de *Trichoderma* spp. no biocontrole *in vitro* de *Rhizoctonia solani*, agente etiológico da mela em feijão-caupi. O patógeno e o antagonista foram confrontados em placas de Petri ( $\emptyset = 90$  mm) contendo o meio de cultura BDA. Foram medidos diariamente o crescimento micelial do antagonista e do patógeno e determinados o Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) e o Percentual de Inibição do Crescimento Radial (PICR) médio e diário da colônia de *R. solani*, em relação à testemunha. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com dez tratamentos, incluindo a testemunha, em cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância aplicando-se o teste F ( $p\text{-valor} \leq 0,05$ ) e o teste de Scott-Knott ( $p\text{-valor} \leq 0,05$ ), utilizando-se o programa SISVAR, versão 5.6. Os resultados mostraram que 33% dos isolados de *Trichoderma* spp. (T41, T51 e T63) apresentaram maior potencial de controle *in vitro* de *R. solani*, reduzindo em 40% o IVCM da colônia do patógeno. O isolado T41 obteve maior PICR médio e os isolados T41, T51 e T63 provocaram o maior PICR no primeiro dia de avaliação. O isolado T41 provocou o menor IVCR e o maior PICR médio e diário, apresentando-se desta forma, com agente de biocontrole potencial de *R. solani*.

**Palavras-chave:** Mela, antagonismo, *Trichoderma* spp., *Vigna unguiculata*.

### Biocontrol Potential of *Rhizoctonia solani* of Cowpea

### ABSTRACT

The potential of nine isolates of *Trichoderma* spp. was evaluated for the *in vitro* biocontrol of *Rhizoctonia solani*, the etiological agent of the thread blight in cowpea. The pathogen and the antagonists were challenged in Petri dishes ( $\emptyset = 90$  mm) containing the PDA culture medium. The mycelial growth of both antagonist and pathogen was measured daily and the Mycelial Growth Rate Index (MGRI) and the Mean Radial Growth Inhibition Percentage (MRGI) of *R. solani* colony was determined in comparison to the control treatment. The experimental design was completely randomized, with ten treatments, including the control, in five replicates. Data were submitted to analysis of variance using the F-test ( $p\text{-value} \leq 0.05$ ) and the Scott-Knott test ( $p\text{-values} \leq 0.05$ ), using the SISVAR program, version 5.6. The results showed that 33% of the isolates of *Trichoderma* spp. (T41, T51 and T63) showed greater potential for *in vitro* control of *R. solani*, reducing the MGRI of the pathogen colony by 40%. The isolate T41 obtained a higher average of PICR and T41, T51 and T63 caused the highest MRGI on the first day of evaluation. The isolate T41 caused the lowest MGRI and the highest mean of daily MGRI, thus considered as a potential biocontrol agent of *R. solani*.

**Keywords:** Web blight; Antagonism; *Trichoderma* spp.; *Vigna unguiculata*.

### Introdução

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] é uma das culturas agrícolas mais consumidas nas regiões Norte e Nordeste do Brasil e representa uma fonte importante de proteína, energia, fibras e minerais, além de conceder emprego e renda para a população (NEVES et al., 2011).

No Brasil, os maiores cultivos de feijão-caupi concentram-se nas regiões Norte e Nordeste devido a sua adaptação aos climas tropical e subtropical do mundo, apresentando potencial para o desenvolvimento social e econômico das populações dessas regiões (FREIRE FILHO et al., 2005), além de ser o principal produto agrícola de subsistência no país (BEZERRA, 2010). Na região Norte, o cultivo de feijão-caupi tem se expandido e garantido uma área plantada de 30,9 mil hectares, com produtividade média de 1310 kg/ha de grãos (CONAB, 2016).

Entretanto, a cultura do feijão-caupi pode ser atacada por algumas doenças, resultando na redução da produtividade, como é o caso da mela, também conhecida como queima da teia micélica, cujo agente etiológico é fungo *Rhizoctonia solani* Kühn (SARTORATO et al., 2006; NECHET et al., 2009). Os sintomas da mela manifestam-se, inicialmente, nas folhas próximas ao solo, com manchas irregulares e posterior necrose,

podendo ocorrer desfolha e a presença de teia micélica do patógeno na face abaxial das folhas atacadas, sendo este o principal sinal da doença (NECHET; HALFELD-VIEIRA, 2006).

Atualmente, cresce o interesse pelo biocontrole de doenças de plantas, por ser uma alternativa ao controle químico. O gênero *Trichoderma* é o mais estudado e utilizado no biocontrole de diversos patógenos que habitam o solo. O interesse por este fungo deve-se a diversos mecanismos de ação no controle de patógenos, como produção de antibióticos voláteis e não-voláteis, competição por espaços e nutrientes, atividade enzimática hidrolítica e parasitismo (BRITO et al., 2014). Além disso, esses micro-organismos não são tóxicos ao homem e animais (MERTZ et al., 2009).

Segundo Broetto et al. (2014), os compostos voláteis produzidos pelas espécies *T. harzianum* e *T. koningiopsis* foram responsáveis pela inibição de 23,1% e 15,4%, respectivamente, do crescimento micelial do fungo *Macrophomina phaseolina*, causador da podridão de carvão em plantas de soja. Louzada et al. (2009) observaram três tipos de interação (penetração, enrolamento e desenvolvimento de hifas paralelas) que comprovam o hiperparasitismo de *Trichoderma* sp. (isolado 50/02) sobre os fungos *Fusarium solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

Esse trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de biocontrole de *R. solani* do feijão-caupi por isolados de *Trichoderma* spp.

## Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, PA, no período de março a junho de 2016.

### Obtenção dos isolados de *Trichoderma* spp.

Os isolados de *Trichoderma* spp. utilizados no experimento foram obtidos de amostras de solo coletadas na Empresa Socôco Produtos Alimentícios S/A e se encontram depositados na coleção de micro-organismos do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental. Foram selecionados para os testes nove isolados que apresentaram melhor desempenho em testes preliminares de antagonismo *in vitro* contra outros fitopatógenos (SILVA, 2016; SOUSA et al., 2015).

### Obtenção do isolado de *Rhizoctonia solani* do feijão-caupi

O patógeno foi isolado de folhas com sintomas de mela em plantio de feijão-caupi cultivado em sistema de plantio direto localizado na Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, PA. O material com sintomas da doença foi levado ao Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental para isolamento indireto do fungo, segundo Alfenas et al. (2007). As placas foram incubadas em câmaras de armazenamento do tipo BOD, à temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 12h (claro/escuro), durante sete dias.

### Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. contra *R. solani*

O antagonismo de *Trichoderma* spp. a *R. solani* foi avaliado pelo método de pareamento de colônias, sendo que as culturas do patógeno e dos antagonistas foram reativadas em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) sete dias antes da instalação do experimento. Os discos de cultura do patógeno e dos antagonistas ( $\varnothing = 5\text{mm}$ ) foram colocados em lados opostos e equidistantes de placas de Petri (5mm de distância da borda) contendo BDA, as quais foram incubadas em BOD, à temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 12 h (claro/escuro).

A avaliação foi iniciada a partir de 24 horas da instalação do experimento, medindo-se diariamente o crescimento radial (mm) das colônias, até o crescimento completo da testemunha na placa. Com os dados obtidos, foi calculado o Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM), segundo equação adaptada de Oliveira (1991):

$$IVCM = \frac{\sum R - Ra}{N}$$

Sendo IVCM= Índice de Velocidade de Crescimento Micelial, R= Raio atual da colônia, Ra= Raio da colônia no dia anterior e N= número de dias após o início do experimento.

Foi determinada a percentagem de inibição do crescimento radial do patógeno nos tratamentos, em relação à testemunha, de acordo com a equação de Ezziyyani et al. (2004):

$$PICR = \frac{(R1 - R2)}{R1}$$

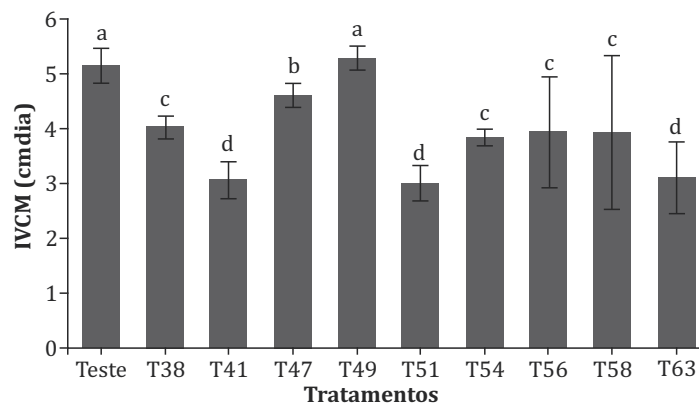
sendo PICR= % de inibição de crescimento micelial, R1= Raio da testemunha e R2= Raio do tratamento.

## Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com dez tratamentos, constituído de nove isolados de antagonistas (T38, T41, T47, T49, T51, T54, T56, T58 e T63) e da testemunha, em cinco repetições. Os resultados obtidos apresentaram distribuição normal e foram submetidos à Análise de Variância, aplicando-se o teste F ( $p\text{-valor} \leq 0,05$ ). As médias de IVCM e PICR foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $p\text{-valor} \leq 0,05$ ), utilizando-se o programa SISVAR, versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

## Resultados e Discussão

Constatou-se que 33% dos isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram maior potencial de controle *in vitro* de *R. solani*. Os isolados T41, T51 e T63 reduziram em 40%, em média, o Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) da colônia de *R. solani* e 44% dos isolados testados (T38, T54, T56 e T58) reduziram o IVCM em 25%, em média, comparados à testemunha. O isolado T49 não interferiu no crescimento micelial do patógeno, não diferindo do crescimento da testemunha (Figura 1).



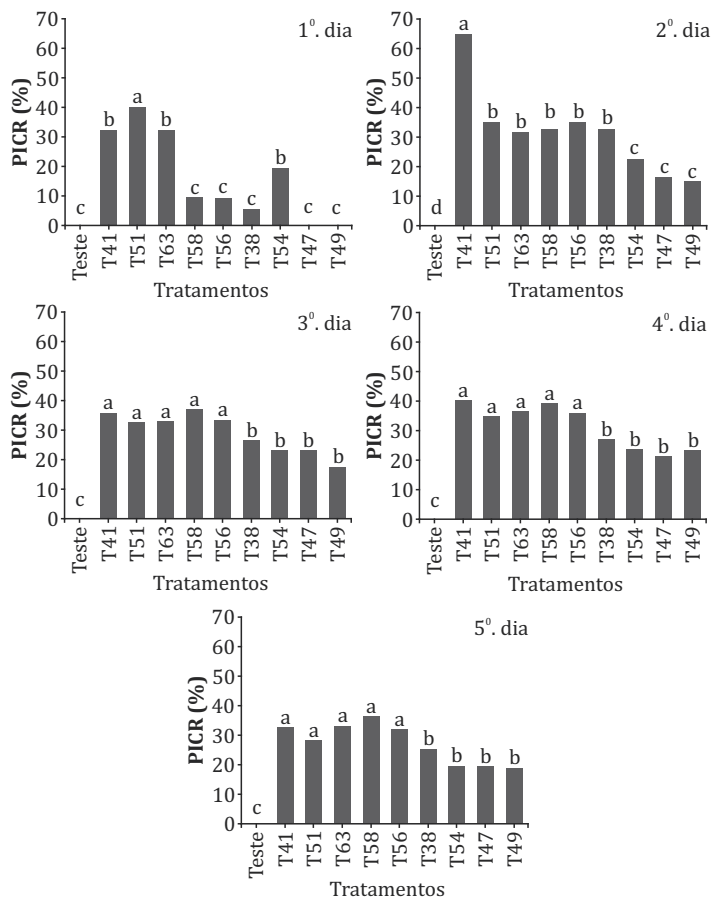
**Figura 1.** Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) de *Rhizoctonia solani* pareado com nove isolados de *Trichoderma* spp. (Letras distintas indicam diferença significativa para o Teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ )). **Figure 1.** *Rhizoctonia solani* Mycelial Growth Rate Index (IVCM) when matched with *Trichoderma* spp. isolates. (Different letters indicate statistically significant differences ( $p \leq 0,05$ ) among treatments for Scott-Knott Test ( $p \leq 0,05$ )).

O isolado que resultou em maior PICR do patógeno foi T41, com 41,64%. Apesar do isolado T51 e T63 terem apresentado um valor baixo referente ao IVCM, com relação ao PICR os seus valores médios de inibição não diferiram estatisticamente dos isolados T58 e T56. Contudo, T41 apresentou maior IVCM e PICR, evidenciando o seu potencial para futuros programas de controle biológico da mela em feijão-caupi (Tabela 1).

**Tabela 1.** Percentual médio de inibição do crescimento radial (PICR) de *Rhizoctonia solani* por isolados de *Trichoderma* spp. *in vitro*. Médias com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). **Table 1.** Inhibition percentage medium colony radial growth (PICR) of the *Rhizoctonia solani* for *Trichoderma* spp. isolates. Different letters indicate statistically significant differences among treatments for Scott-Knott Test ( $p \leq 0,05$ )).

Isolado de <i>Trichoderma</i> spp.	PICR (%)
T41	41,637 a*
T51	34,456 b
T63	33,947 b
T58	31,383 b
T56	29,953 b
T38	23,895 c
T54	22,429 c
T47	15,964 d
T49	15,199 d

Em relação ao PICR diário, no primeiro dia de avaliação, o crescimento de *R. solani* foi maior na presença dos isolados T41, T51 e T63, enquanto que no segundo dia, o maior potencial de inibição do patógeno foi obtido pelo isolado 41. No entanto, do terceiro ao quinto dia de avaliação, o maior PICR foi constatado nos tratamentos com os isolados T41, T51, T63, T58 e T56 (Figura 2). O isolado T41 foi o que resultou no maior PICR em todos os dias de avaliação.



**Figura 2.** Percentual de inibição do crescimento radial (PICR) diário de *Rhizoctonia solani* pareado com nove isolados de *Trichoderma* spp. (Letras iguais no mesmo dia de avaliação não diferiram estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ )). / **Figure 2.** Inhibition percentage of the pathogen colony radial growth (PICR) when matched with nine *Trichoderma* spp. Isolates. (Different letters indicate statistically significant differences ( $p \leq 0,05$ ) among treatments for Scott-Knott Test ( $p \leq 0,05$ )).

Resultados similares foram encontrados por Silva et al. (2015) no pareamento entre *Sclerotinia sclerotiorum* e *Trichoderma* spp, em que a presença do patógeno acelerou o crescimento micelial do antagonista, o que pode ser explicado pela sua habilidade de supressão. Meza et al. (2008) relataram a eficiência da espécie *Trichoderma harzianum* no controle de *Fusarium solani*, quando o patógeno apresentou raio de crescimento micelial menor na presença do antagonista. Essa espécie de *Trichoderma* também foi eficiente no controle de *R. solani* isolado de morangueiro, onde o antagonista apresentou crescimento micelial médio de 6,8 cm e o patógeno, de 3,1 cm (GUÉDEZ et al., 2009).

Além do menor crescimento micelial, foi encontrado por Meza et al. (2008), também, o PICR do patógeno maior do que 50% para todos os tratamentos de biocontrole *in vitro* realizados com *T. harzianum*, concordando com o estudo feito por Reyes et al. (2008) sobre o potencial antagonístico de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia* sp., que observaram inibição do crescimento radial entre 34 e 83%.

A característica antagonística do gênero *Trichoderma* spp. pode ser atribuída tanto pela competição que ocorre com o patógeno, quanto pela produção de antibióticos inibidores de crescimento de outros fungos, como gliotoxina, viridina, trichodermina, suzucacilina, alameticina e dermadina (DENNIS; WEBSTER, 1971). Outra possível explicação para sua atividade antagonística é a produção de enzimas hidrolíticas como celulase e hemicelulase, que são responsáveis pela degradação de materiais como lignina e celulose e causam a quebra da parede celular de fungos patogênicos (MELO, 1996). No entanto, diferentes isolados de *Trichoderma* spp. podem apresentar diferentes mecanismos de ação, podendo ser eficientes ou não no biocontrole de fitopatógenos. Louzada et al. (2009) avaliaram 230 isolados monospóricos de *Trichoderma* spp. Contra *S. sclerotiorum* e *F. solani* e constataram que apenas 10% dos isolados foram eficientes na inibição do crescimento micelial do patógeno. Bonnett et al. (2013) observaram que o *T. viride* resultou em inibição micelial do fungo *Colletotrichum musae* superior a 14% do que o *T. harzianum*. Ou seja, diferentes isolados de *Trichoderma* spp. podem apresentar comportamento diferente no biocontrole de fitopatógenos.

## Conclusão

O isolado T41 proporcionou menor Índice de Velocidade de Crescimento Micelial e maior Percentual de Inibição do Crescimento Radial médio e diário de *R. solani*, apresentando-se com potencial para o biocontrole do agente etiológico da mela do feijão-caupi.

## Referências Bibliográficas

- ALFENAS, A.C.; FERREIRA, F.A.; MAFIA, R.G.; GONÇALVES, R.C. Isolamentos de fungos patogênicos. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. (Editores). **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: Ed. UFV, 2007. p. 53-64.
- BENÍTEZ, T.; RICÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v.7, n.4, p. 249-260, 2004.
- BEZERRA, A. K. P.; LACERDA, C. F.; HERNANDEZ, F. F. F.; SILVA, F. B.; GHEYI, H. R. Rotação cultural feijão-caupi/milho utilizando-se águas de salinidades diferentes. **Ciência Rural**, v.40,n.5, p.1.075-1.082, 2010.
- BONETTA, L. P.; HURMANN, E. M. S.; POZZA JÚNIOR, M. C.; ROSA, T. B.; SOARES, J. L. Biocontrole *in Vitro* de *Colletotrichum musae* por Isolados de *Trichoderma* spp. **INICIÊNCIAS**, v.17, n. 1, p. 5-10, 2013.
- BRITO, J. P. C.; RAMADA, M. H. S.; MAGALHÃES, M. T. Q.; SILVA, L. P.; ULHOA, C. J. Peptaibols from *Trichoderma asperellum* TR 356 strain isolated from Brazilian soil. **Springer Plus**, v.3, n. 1, p. 600-610, 2014.
- BROETTO, L.; COLTRO-RONCATO, S.; MEINERZ, C. C.; DILDEY, O. D. F.; PAZDIORA, P. C.; GONÇALVES, E. D. V.; MORAES, A. J.; HENKEMEIER, N. P.; KUHN, O. J.; STANGARLIN, J. R. Crescimento micelial e produção de microescleródios de *Macrophomina phaseolina* confrontado com diferentes isolados de *Trichoderma* sp. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 13, n. 4, p. 310-317, 2014.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos**. Safra 2015/16 - Oitavo levantamento, Brasília, v. 3, n. 8, p. 1-178, maio, 2016.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: III. Hyphal interaction. **Transactions of the British Mycological Society**, v.57, n. 1, p. 59-363. 1971.
- EZZIYANI, M.; PÉREZ, S. C.; REQUENA, M. E.; RUBIO, L.; CANDELA, M. E. Biocontrol por *Streptomyces rochei* (Ziyani), de la podre dumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. **Anales de Biología**, n.26, p.69-78, 2004.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, P. D.; SANTOS, A. A. Melhoramento genético. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. de A.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 30-92.



- GUÉDEZ, C.; CAÑIZÁLEZ, L.; CASTILLO, C.; OLIVAR, R. Efecto antagonico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos post cosecha de la fresa (*Fragaria* spp.). **Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología**, v.29, p. 34-38, 2009.
- LOUZADA, G. A. S.; CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JÚNIOR, M.; MARTINS, I.; BRAÚNA, L. M. Potencial antagonico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecosistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota Neotropica**, v. 9, n. 3, p. 145-149, 2009.
- MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 4, p. 261-295, 1996.
- MERTZ, L. M.; HENNING, F. A.; ZIMMER, P. D. Bioprotetores e fungicidas químicos no tratamento de sementes de soja. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 13-18, 2009.
- MEZA, C. L. S.; BARBOSA, R. J. F.; VALERO, N. O.; CARRILLO, R. M. G.; REDONDO, A. R. P. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez em maracuyá. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 10, n. 2, p. 35-43, 2008.
- NECHET, K. L.; HALFELD-VIEIRA, B. A.; BOARI, A. J.; NASCIMENTO, J. F. 2009. Doenças. In: ZILLI, J. E.; VILARINHO, A. A **cultura do feijão-caupi na Amazônia Brasileira**. Boa Vista. Embrapa Roraima. p. 245-270.
- NECHET, K. L.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Caracterização de isolados de *Rhizoctonia* spp., associados à mela do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), coletados em Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 505-508, 2006.
- NEVES, A. C.; CÂMARA, J. A. S.; CARDOSO, M. J.; SILVA, P. H. S.; SOBRINHO, C. A. **Cultivo do feijão-caupi em sistema agrícola familiar**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 15p. (Embrapa Meio-Norte. Circular Técnica, 51).
- OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tombamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas*L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.)**.1991. 111 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.
- REYES, Y.; MARTÍNEZ, B.; INFANTE, D. Evaluación de la actividad antagonica de trece aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* sp. **Revista Protección Vegetal**, v. 23, n. 2, p. 112-117, 2008.
- SARTORATO, A.; NECHET, K. L.; HALFELD-VIEIRA, D. A. Diversidade Genética de Isolados de *Rhizoctonia solani* coletados em Feijão-caupi no Estado de Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, n.3, p. 297-301, 2006.
- SILVA, G. B. P.; HECKLER, L. I.; SANTOS, R. F.; DURIGON, M. R.; BLUME, E. Identificação e utilização de *Trichoderma* spp. armazenados e nativos no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Revista Caatinga**, v. 28, n. 4, p. 33-42, 2015.
- SILVA, C. M. **Distribuição espacial do anel vermelho e da resinose e agentes potenciais de controle biológico do *Bursaphelenchus cocophilus* em coqueiro**. 2016. 63 f. Tese (Doutorado em Agronomia/ Área de Concentração Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia/ Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2016.
- SOUSA, I. A. L.; BENCHIMOL, R. L.; SILVA, C. M.; SANTOS, A. K. A.; PINHEIRO, C. C.; PALMEIRA, T. S. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Rhizoctonia solani*, agente causal da mela em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). **Anais XIII Seminário Anual PIBIC – UFRA, Produção Vegetal e Agroecosistemas**, 2015.