

# Caracterização de Isolados de *Rhizoctonia* spp., Associados à Mela do Feijão-Caupi (*Vigna unguiculata*), Coletados em Roraima

Kátia L. Nechet & Bernardo A. Halfeld-Vieira

Embrapa Roraima, BR 174, km 08, Cx. Postal 133, CEP 69301-970, Boa Vista, RR, e-mail: katia@cpafrr.embrapa.br

(Aceito para publicação em 16/10/2006)

Autor para correspondência: Kátia de Lima Nechet

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* 31:505-508. 2006.

## RESUMO

A mela causada pelo fungo *Rhizoctonia solani* (teleomorfo *Thanatephorus cucumeris*) é a principal doença que afeta a cultura do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) no Estado de Roraima. Este trabalho teve como objetivo caracterizar 28 isolados de *Rhizoctonia* spp. obtidos de plantas de feijão-caupi com sintoma de mela, coletados em ecossistemas de mata e de cerrado em Roraima. Foram avaliados o número de núcleos, a taxa de crescimento micelial, a formação e o tamanho de microescleródios, o grupo de anastomose e realizado teste de patogenicidade. Um isolado proveniente do cerrado foi identificado como binucleado e os demais isolados, de mata e de cerrado, como multinucleados. A taxa de crescimento micelial, em meio batata-dextrose-agar a 25 °C e escuro contínuo, variou de 2,1-5,3 cm.dia<sup>-1</sup> para os isolados de mata e de 2,7-5,8 cm.dia<sup>-1</sup> para os isolados de cerrado. Nestas mesmas condições, após três a quatro dias foi observada a formação de microescleródios. Dois grupos foram diferenciados: um grupo com formação de 10-50 microescleródios.placa<sup>-1</sup>, em forma de tufo, inicialmente brancos e tornando-se marrom claro, de 1-2 mm (maioria dos isolados de mata) e outro grupo com mais de 100 microescleródios.placa<sup>-1</sup>, de coloração marrom e 68-541 µm (maioria dos isolados de cerrado). Dos 28 isolados coletados, 24 foram identificados como pertencentes ao grupo de anastomose GA1-1A de *Rhizoctonia solani*.

**Palavras-chave adicionais:** *Rhizoctonia solani*, *Thanatephorus cucumeris*, *Vigna unguiculata*.

## ABSTRACT

### Characterization of *Rhizoctonia* spp. associated with cowpea web (*Vigna unguiculata*) blight in Roraima, Brazil

The web blight caused by the fungus *Rhizoctonia solani* (teleomorph *Thanatephorus cucumeris*) is an important disease of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] in Roraima state, Brazil. The aim of this work was to characterize 28 *Rhizoctonia* spp. isolates from cowpea plants with web blight, collected in two ecosystems (savannah and forest) in Roraima state. The characteristics evaluated were nuclear number, radial growth rate, the presence and morphology of microsclerotia, anastomosis group (AG) and pathogenicity test. One savannah isolate was binucleate and the others, savannah and forest isolates, were multinucleate. The radial growth rate on potato-dextrose-aga, at 25 °C in the dark, was 2.1 to 5.3 cm.day<sup>-1</sup> for forest isolates and 2.7 to 5.8 cm.day<sup>-1</sup> for savannah isolates. In these conditions, after three to four days, microsclerotia formation was observed. Two types of microsclerotia were differentiated: one type of 10 to 50 microsclerotia.Petri dish<sup>-1</sup>, formed as flat sclerotia mass, which was white when young and pale brown at maturity, 1 to 2 mm in diameter (most forest isolates) and another type of 100 microsclerotia.Petri dish<sup>-1</sup>, brown color, 68 to 541 µm in diameter (most savannah isolates). Among 28 *Rhizoctonia* isolates collected in Roraima state, 24 anastomosed with AG1-1A of *Rhizoctonia solani*.

**Additional keywords:** *Rhizoctonia solani*, *Thanatephorus cucumeris*, *Vigna unguiculata*.

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é a leguminosa alimentar mais importante das regiões norte e nordeste do Brasil, sendo considerada a principal fonte de proteínas das populações de baixa renda (Freire Filho *et al.*, 2005). Em Roraima, o plantio de feijão-caupi é tradicionalmente conduzido por pequenos produtores, incluindo as comunidades indígenas, em áreas de até 1 ha, mas com perspectivas de expansão da área plantada por grandes produtores como uma cultura de sucessão da soja. Neste caso, deve-se levar em consideração que o feijão-caupi e a soja são hospedeiros de vários patógenos de solo em comum, podendo aumentar a densidade do inóculo nas áreas de plantio.

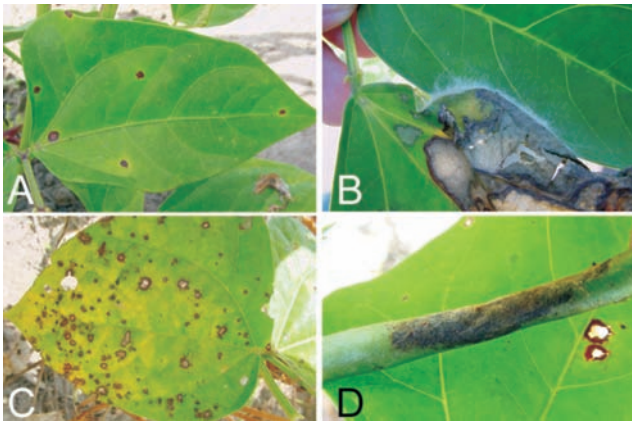
A mela causada pelo fungo *Rhizoctonia solani* Kühn [teleomorfo *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk] é a

principal doença da cultura em Roraima. Em condições de campo, observa-se desfolha de 3 a 80% em linhagens de feijão-caupi de porte ereto (Nechet *et al.*, 2005) e redução de 577 kg.ha<sup>-1</sup> na produção do genótipo suscetível (80% desfolha) quando comparado com os genótipos resistentes (3-18%) (Vilarinho *et al.*, 2005).

Os principais sintomas da mela são observados nas folhas das plantas. Dois tipos de manchas podem ser identificados: manchas causadas por microescleródios, de formato circular e coloração marrom (Figura 1A) ou manchas causadas pelo micélio do fungo, de formato irregular, inicialmente aquosas, mais claras no centro e delimitadas por uma borda escura (Figura 1B). Com o progresso da doença, observa-se, também, a adesão das folhas da planta pela teia

micélica do fungo (Figura 1C), e a desfolha das plantas. O sintoma da doença pode ser observado também em vagens, com lesões escuras de formato irregular e grande extensão (Figura 1D).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar isolados de *Rhizoctonia* spp., obtidos de plantas de feijão-caupi com sintoma de mela, coletados em ecossistema de mata e de cerrado no estado de Roraima, utilizando como parâmetros a morfologia da colônia, taxa de crescimento micelial, formação e tamanho de microescleródios, número de núcleos, grupo de anastomose e teste de patogenicidade.



**FIG. 1-** Sintomas da mela em feijão-caupi causada por *Rhizoctonia solani*. **A.** Mancha foliar causada pela infecção de microescleródios; **B.** Teia micélica, característica da doença; **C.** Mancha foliar causada pela infecção por micélio; **D.** Mancha em vagem de feijão-caupi.

Folhas de feijão-caupi, com sintomas da doença, foram coletadas em áreas de mata (Argissolo vermelho amarelo, textura média) e de cerrado (Latossolo amarelo, textura arenosa) no estado de Roraima, catalogadas e herborizadas em coleção no laboratório de fitossanidade da Embrapa Roraima. A partir de fragmentos do tecido foliar lesionado foi realizada a técnica do isolamento indireto em meio de Batata Dextrose Agar (BDA) para se obter colônias de *Rhizoctonia* spp. Vinte e oito isolados foram obtidos a partir das coletas (15 de área de mata e 13 de área de cerrado). Os isolados foram conservados *in vitro* pelo método de preservação em sílica-gel (Dhingra & Sinclair, 1995).

Cada isolado foi semeado em placas de Petri contendo meio BDA. As placas foram mantidas por três dias a 25 °C no escuro. Para a medição da taxa de crescimento micelial, um disco de micélio proveniente destas placas foi transferido para cinco placas de petri contendo meio BDA e mantidas a 25 °C no escuro. A medição ortogonal do diâmetro da colônia foi feita diariamente até o crescimento máximo da colônia. Foram verificados a coloração da colônia, presença ou não de microescleródios, forma e tamanho de microescleródios.

Para a determinação do número de núcleos, amostras de hifas, obtidas da periferia de colônias crescidas em placas de Petri contendo meio BDA a 25 °C no escuro

por 24 horas, foram removidas e colocadas em lâmina de microscopia contendo uma solução de safranina alcalina (0,5% de safranina, 10 mL de KOH 3%, 5 mL glicerina e 79 mL de água destilada) e cobertas com laminulas. Em microscópio ótico foi contado o número de núcleos de 20 células de cada isolado. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições, cada repetição foi constituída por uma placa de Petri.

A determinação do grupo de anastomose foi feita utilizando-se a técnica da lâmina de vidro para microscopia (Ceresini *et al.*, 1996). Os isolados padrões utilizados foram GA1-IA; GA1-IB; GA-2 IIIB; GA3 ST9; GA3 ST11-6; GA4 AHI; GA4 140; GA7-H0; GA-BI TS-2-4. Tanto os isolados padrões como os isolados de *Rhizoctonia* spp. obtidos de feijão-caupi foram semeados em placas de Petri contendo meio BDA por 48 horas a 25 °C no escuro. Após este período, um disco de micélio de cada isolado a ser identificado foi transferido assepticamente para a extremidade de uma lâmina de vidro esterilizada contendo uma fina camada de agar-água. Na outra extremidade foi depositado um disco de micélio do isolado padrão. As lâminas foram mantidas em placas de Petri a 25 °C no escuro. Após 24 horas, foi observada a anastomose de hifas em microscópio ótico utilizando solução de safranina-O 0,03% + KOH 3%. A reação de anastomose foi considerada positiva quando se observou o contato de hifas, fusão da parede celular e morte de células adjacentes (Parmeter *et al.*, 1969). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, cada repetição constituída de uma lâmina de vidro.

Para o teste de patogenicidade, os isolados obtidos foram semeados em placas de Petri contendo meio BDA a 25 °C no escuro. Após 10 dias, transferiu-se 10 mL de água destilada para cada placa de Petri, obtendo-se uma suspensão de microescleródios ou fragmento de micélio, filtrada em gaze e ajustada para  $1 \times 10^5$  microescleródios ou fragmentos de micélio/mL. Para cada isolado, a suspensão + Tween 20 a 0,05% foi pulverizada em cinco plantas de feijão-caupi cv. Mazagão no estágio de dois a três trifólios, utilizando-se um atomizador. Outras cinco plantas, utilizadas como controle, foram pulverizadas com água destilada + Tween 20 a 0,05%. As plantas foram mantidas em câmara úmida por 24 h em temperatura ambiente e depois transferidas para condições de telado. A avaliação foi feita a cada três dias. Nas plantas em que se observou sintoma da doença foi feito o reisolamento do patógeno, através do isolamento indireto em meio BDA, para completar o postulado de Koch.

Dentre os 28 isolados de *Rhizoctonia* spp., associados a mela do feijão-caupi em Roraima, apenas um isolado coletado em ecossistema de cerrado (154) apresentou condição binucleada (Tabela 1). Os demais isolados foram identificados como multinucleados, apresentando mais de 5 núcleos por célula.

A taxa de crescimento micelial dos isolados é apresentada na Tabela 1. Quando comparado por ecossistema, não houve diferença entre a taxa de crescimento dos isolados coletados na mata e no cerrado.

A taxa de crescimento micelial variou de 2,1 – 5,3 cm.dia<sup>-1</sup> para os isolados de mata e de 2,7 – 5,8 cm.dia<sup>-1</sup> para os isolados de cerrado (Tabela 1). Todos os isolados apresentaram colônias de coloração inicialmente branca, que tornavam-se marrom a escuro com o envelhecimento da colônia. A formação de microescleródios foi observada em todas as colônias, mas dois grupos puderam ser diferenciados: a) isolados com formação de 10-50 microescleródios.placa<sup>-1</sup>, em forma de tufos, inicialmente brancos que tornavam-se marrom claro, com presença de exsudatos, variando de 1-2 mm. Esse padrão foi característico dos isolados coletados em mata, com exceção dos isolados 141 e 141h, e para cinco isolados coletados em cerrado (Tabela 1); b) isolados com formação de mais de 100 microescleródios.placa<sup>-1</sup>, pequenos, de coloração marrom, variando de 68-541 µm. Esse padrão foi observado para

oitos isolados coletados em cerrado e para os isolados 141 e 141h, coletados em mata (Tabela 1).

Dentre os isolados, 24 foram determinados como pertencentes ao grupamento de anastomose GAI-1A de *R. solani* (Tabela 1). Segundo o critério de MacNish *et al.* (1993) a reação foi caracterizada como C2, onde se observou morte das células em anastomose e das células adjacentes. O grupamento de anastomose dos isolados 200k, 200f e 200q, coletados em ecossistema de cerrado, não foi identificado. A reação destes isolados com os padrões de *R. solani* foi caracterizada como C0, em que as hifas cresceram por cima uma das outras, não havendo reconhecimento entre os isolados pareados. Estes isolados deverão ser identificados quando pareados com outros grupos padrões de *R. solani*.

Todos os isolados foram patogênicos a plantas de

**TABELA 1.** Condição nuclear, taxa de crescimento micelial, tamanho de microescleródios e grupo de anastomose dos isolados de *Rhizoctonia* spp., associados à mela do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), coletados nos ecossistemas de mata e de cerrado do estado de Roraima

Isolado	Condição nuclear	TCM <sup>1</sup> (cm.dia <sup>-1</sup> )	Microescleródios	GA <sup>2</sup>
<b>Isolados coletados em ecossistema de mata</b>				
220l	Multinucleado	2,1	1,2 mm	GA1- 1A
220c	Multinucleado	2,2	1,2 mm	GA1- 1A
220b	Multinucleado	2,3	1,3 mm	GA1- 1A
210e	Multinucleado	2,4	1,3 mm	GA1- 1A
141	Multinucleado	2,7	127 µm	GA1- 1A
141h	Multinucleado	2,8	86 µm	GA1- 1A
201a	Multinucleado	3,0	1,3 mm	GA1- 1A
201b	Multinucleado	3,0	1,8 mm	GA1- 1A
220d	Multinucleado	3,0	1,6 mm	GA1- 1A
220j	Multinucleado	3,8	1,9 mm	GA1- 1A
208d	Multinucleado	4,5	1,7 mm	GA1- 1A
201c	Multinucleado	4,6	1,6 mm	GA1- 1A
220k	Multinucleado	5,0	1,4 mm	GA1- 1A
220m	Multinucleado	5,1	1,9 mm	GA1- 1A
220h	Multinucleado	5,3	1,6 mm	GA1- 1A
<b>Isolados coletados em ecossistema de cerrado</b>				
200c	Multinucleado	2,7	2,0 mm	GA1- 1A
200	Multinucleado	2,8	541 µm	GA1- 1A
200s	Multinucleado	2,8	503 µm	GA1- 1A
200h	Multinucleado	3,0	469 µm	GA1- 1A
200b	Multinucleado	3,1	1,8 mm	GA1- 1A
154	Binucleado	3,3	91 µm	-
200o	Multinucleado	3,7	75 µm	GA1- 1A
200m	Multinucleado	4,0	1,5 mm	GA1- 1A
200k	Multinucleado	4,1	75 µm	-
200p	Multinucleado	4,4	1,3 mm	GA1- 1A
200n	Multinucleado	4,5	2,3 mm	GA1- 1A
200d	Multinucleado	4,7	1,9 mm	GA1- 1A
200f	Multinucleado	5,3	70 µm	-
200q	Multinucleado	5,8	68 µm	-

<sup>1</sup>TCM= Taxa de crescimento micelial

<sup>2</sup>GA= grupo de anastomose

feijão-caupi cv. Mazagão e reisolados das folhas com sintoma da doença, completando os postulados de Koch. Os primeiros sintomas foram observados sete dias após a inoculação quando as plantas foram pulverizadas com a suspensão de microescleródios. Plantas inoculadas com suspensão de fragmentos de micélio apresentaram os primeiros sintomas entre 10-15 dias após a inoculação. Após 20 dias, em condições de temperatura < 30 °C e umidade relativa em torno de 80%, observou-se a formação de microescleródios nas plantas inoculadas com a suspensão de microescleródios, inclusive nas plantas inoculadas com o isolado binucleado que apresentaram 50% de desfolha.

No Brasil, isolados de *Rhizoctonia* spp. binucleados já haviam sido relatados associados a podridão do hipocótilo na soja (Fenille *et al.*, 2002), necrose em eucalipto (Silveira *et al.*, 2000) e podridão do colo e/ou radicular no feijoeiro (Ceresini & Souza, 1997). Este é o primeiro relato de *Rhizoctonia* sp. binucleada como agente causal da mela no feijão-caupi.

*Rhizoctonia solani* associada a doenças com sintoma de queima foliar em diversas culturas, como feijão, milho, sorgo, algodão, soja e arroz, podem pertencer a GAI-IA ou GAI-IB (Ogoshi, 1987; Pascual *et al.*, 2000; Sneh *et al.*, 1991). No Brasil, Fenille *et al.* (2002) relataram a associação de isolados de *R. solani* GAI-IA com a mela da soja. Na literatura não se encontrou nenhum trabalho de caracterização de isolados de *Rhizoctonia* spp. que incidem na cultura do feijão-caupi. Portanto, este é o primeiro trabalho com informações sobre a caracterização morfológica, de patogenicidade e do grupamento de anastomose de isolados de *Rhizoctonia* spp. associados a mela do feijão-caupi.

### AGRADECIMENTO

Os autores agradecem a Fundação Estadual do Meio Ambiente, Ciência e Tecnologia de Roraima - FEMACT pelo suporte financeiro.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CERESINI, P.C., FENILLE, R.C. & SOUZA, N.L. Associação de *Rhizoctonia* spp. binucleadas e de *R. solani* Kühn GA 4 HGI e GA 2-2 IIIB ao feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) no estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica* 23:14-24. 1997.
- DHINGRA, O.D. & SINCLAIR, J.B. Basic Plant Pathology Methods. New York NY. CRC Press. 1995.
- FENILLE, R.C., SOUZA, N.L. & KURAMAE, E.E. Characterization of *Rhizoctonia solani* associated with soybean in Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 108:783-792. 2002.
- FREIRE FILHO, F.R., LIMA, J.A.A. & RIBEIRO, V.Q. Feijão-Caupi. *Avanços Tecnológicos*. Brasília. Embrapa Informação Tecnológica. 2005.
- MacNISH, G.C., CARLING, D.E. & BRAINARD, K.A. Characterization of *Rhizoctonia solani* AG-8 from bare patches by pectic isozyme (zymogram) and anastomosis techniques. *Phytopathology* 83:922-927. 1993.
- NECHET, K.L., HALFELD-VIEIRA, B.A. & VILARINHO, A.A. Avaliação da resistência de genótipos de feijão-caupi à mela (*Rhizoctonia solani*) no cerrado de Roraima. *Fitopatologia Brasileira* 30:S81. 2005. (Resumo)
- OGOSHI, A. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Annual Review of Phytopathology* 25:125-143. 1987.
- PARMETER, J.R., SHERWOOD, R.T. & PLATT, W.D. Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology* 59:1270-1278. 1969.
- PASCUAL, C.B., TODA, T., RAYMONDO, A.D. & HYAKUMACHI, M. Characterization by conventional techniques and PCR of *Rhizoctonia solani* isolates causing banded leaf sheath blight in maize. *Plant Pathology* 49:108-118. 2000.
- SILVEIRA, S.F., ALFENAS, A.C., FERREIRA, F.A. & SUTTON, J.C. Characterization of *Rhizoctonia* species associated with foliar necrosis and leaf scorch of clonally-propagated *Eucalyptus* in Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 106:27-36. 2000.
- SNEH, B., BURPEE, L. & OGOSHI, A. Identification of *Rhizoctonia* species. Saint Paul MN. APS Press. 1991.
- VILARINHO, A. A., FREIRE FILHO, F.R., ROCHA, M.M., RIBEIRO, V.Q. & VILARINHO, L.B.O. Adaptabilidade e estabilidade de linhagens de feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) de porte ereto em Roraima. Anais, 3º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, Gramado, RS. 2005. CD-ROM.