

## Sobrevivência de Micélio e Escleródios de *Rhizoctonia solani* Tratados com *Trichoderma* spp., em Restos de Cultura de *Eucalyptus* sp.

Sandra Kunieda-Alonso<sup>1</sup>, Acelino C. Alfenas<sup>2</sup> & Luiz A. Maffia<sup>3</sup>

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa, MG, fax: (31) 3899-2240;

<sup>1</sup>e-mail: sandrak@permanente.com.br; <sup>2</sup>e-mail: aalfenas@ufv.br; <sup>3</sup>e-mail: lamaffia@mail.ufv.br

(Aceito para publicação em 18/10/2004)

Autor para correspondência: Acelino Couto Alfenas

---

KUNIEDA-ALONSO, S., ALFENAS, A.C. & MAFFIA, L.A. Sobrevivência de micélio e escleródios de *Rhizoctonia solani* tratados com *Trichoderma* spp., em restos de cultura de *Eucalyptus* sp. Fitopatologia Brasileira 30:164-168. 2005.

### RESUMO

Este trabalho objetivou estudar a sobrevivência de micélio e escleródios de *Rhizoctonia solani* AG1-1C, em restos de cultura de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) e avaliar a eficiência dos isolados *Trichoderma longibrachiatum* (UFV-1) e *T. inhamatum* (UFV-2 e UFV-3), comprovadamente antagonísticos a *R. solani*, em reduzir a sobrevivência do patógeno, em condições de campo. Ao longo de 12 meses de avaliação, a sobrevivência de *R. solani* em folhas de eucalipto infetadas não foi afetada por fatores ambientais e tampouco por possíveis antagonistas de ocorrência natural. Por outro lado, a sobrevivência dos escleródios decresceu progressivamente, atingindo cerca de 26%. Não se constatou influência dos isolados de *Trichoderma* spp. na sobrevivência de *R. solani* em folhas infetadas de eucalipto. Entretanto, redução significativa e contínua na viabilidade de escleródios, foi observada, equiparando-se ao tratamento com fungicida, aos 25 dias após inoculação dos antagonistas, sendo os três isolados igualmente efetivos. Já, a sobrevivência no tratamento com fungicida, atingiu níveis significativamente baixos na primeira avaliação, mas sua eficiência foi reduzida ao longo do período experimental. Redução progressiva e contínua na sobrevivência de escleródios da testemunha foi também constatada, mas inferior a quaisquer dos tratamentos.

**Palavras-chave adicionais:** queima de folhas, controle biológico, restos culturais.

### ABSTRACT

#### Survival of *Rhizoctonia solani* mycelia and sclerotia treated with *Trichoderma* spp., in *Eucalyptus* sp. litter

The survival of mycelium and sclerotia of *Rhizoctonia solani* AG1-1C was studied in *Eucalyptus* sp. litter treated with the antagonists *Trichoderma longibrachiatum* (UFV-1) and *T. inhamatum* (UFV-2 and UFV-3) isolates. For 12 months, *R. solani* survival in *Rhizoctonia* infected eucalypt leaves, was apparently not affected by environmental factors, nor by possible naturally occurring antagonists. On the other hand, the sclerotial rate survival decreased progressively reaching 26%. The influence of *Trichoderma* spp. isolates did not affect *R. solani* survival in eucalypt-infected leaves, but significant and continuous reduction of sclerotia viability was observed when compared to captan treatment, 25 days after treatment with the antagonists. The survival in the fungicide treatment reached significantly low levels in the first evaluation, but its efficiency decreased with time. Progressive reduction and continuous survival of sclerotia was detected in the control as well, but significantly less than any other treatment.

**Additional keywords:** leaf blight, biological control, litter.

---

*Rhizoctonia solani* Kühn (*Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk) é um dos principais patógenos que ocorrem na cultura do eucalipto (*Eucalyptus* spp.). Em plantios comerciais, *R. solani* incide inicialmente sobre as folhas de ramos rasteiros, por meio de crescimento micelial epifítico a partir de solo infestado. Posteriormente, ataca as folhas de ramos superiores, causando a queima ascendente na copa. O espaçamento reduzido entre plantas, a irrigação e o intenso crescimento vegetativo de mudas em viveiro favorecem a disseminação e a multiplicação do patógeno, que causa a queima de folhas. Brotações, contendo micélio e escleródios

do patógeno, podem constituir fonte de inóculo às estacas para enraizamento (Alfenas *et al.*, 2004). A habilidade saprofítica competitiva, o potencial patogênico e a vasta gama de hospedeiros tornam *R. solani* um patógeno economicamente importante (Menzies, 1970). O fungo sobrevive no solo e em restos de cultura na forma micelial ou esclerodial. A eliminação de plantas mortas infetadas, folhas e ramos doentes e a coleta seletiva de brotos sadios, em jardins e minijardins clonais a céu aberto, constituem medidas de controle da mela de estacas para enraizamento (Silveira *et al.*, 2003; Alfenas *et al.*, 2004). No entanto, essas medidas,

embora reduzam a quantidade de inóculo, não eliminam o patógeno no solo ou substrato. Este pode ser levado às brotações por respingos de água e dispersão de partículas do solo infestado (Alfenas *et al.*, 2004). A pulverização de fungicidas em restos culturais de eucalipto infestados não erradica o patógeno, por não atingir grande parte das estruturas voltadas para o solo e, em particular, por ser ineficiente contra escleródios (Silveira *et al.*, 2003). Além disso, não se conhece o efeito dos fungicidas sobre a possível flora antagonista natural e nem o registro de produtos para utilização na cultura do eucalipto. Desse modo, o controle biológico pode tornar-se uma estratégia viável de manejo da doença.

Dentre os fungos utilizados em programas de controle biológico de doença de plantas, destacam-se muitas espécies do gênero *Trichoderma* Pers. que parasitam hifas e escleródios de *Rhizoctonia* sp. (Mukherjee *et al.*, 1995), e podem reduzir sua sobrevivência.

O uso de fungicidas e a limpeza fitossanitária em viveiro de eucalipto não são suficientes para erradicar o inóculo do patógeno. Assim, este trabalho objetivou estudar a longevidade de micélio e escleródios de *R. solani*, em restos de cultura de eucalipto e avaliar a eficiência dos isolados *T. longibrachiatum* Rifai (UFV-1) e *T. inhamatum* Veerkamp & Gams (UFV-2 e UFV-3), comprovadamente antagonísticos a *R. solani*, em reduzir a sobrevivência do patógeno, em condições de campo.

Utilizou-se um isolado de *R. solani*, AG1-1C (RH-15), obtido de folhas de eucalipto com sintoma de queima. Para a produção de escleródios, micélio do patógeno foi triturado em água desionizada esterilizada (1 g/l) em um homogeneizador tipo Polytron, modelo PT 10/35 (Brinkman Instruments®), velocidade 4, durante 1 min. Feixes com cerca de dez ramos com folhas de eucalipto foram desinfestados por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 0,1%. Em seguida, os ramos foram imersos na suspensão micelial e colocados em câmara de nevoeiro a 25±2 °C e fotoperíodo de 12 h. Após 12 dias, os ramos foram retirados e secos ao ar, no interior da casa de vegetação.

Ramos com escleródios e folhas contendo lesões de *R. solani* foram acondicionados, separadamente, em saquinhos brancos de náilon (10 x 10 cm), malha 2 mm. Estes foram levados para a área de multiplicação clonal de eucalipto, em Viçosa, MG, onde foram colocados em contato com restos de poda das cepas (tocos de árvores após o corte). O ensaio foi montado em blocos casualizados, com três blocos de 12 saquinhos de náilon cada. Os 12 saquinhos destinaram-se à amostragem destrutiva por 12 meses. A sobrevivência do patógeno foi avaliada mediante plaqueamento de escleródios e fragmentos de folhas em ágar-água a 2%, contendo 1 ppm de benomyl, para evitar-se a interferência de fungos antagonistas e saprófitas, nas avaliações. Semearam-se 100 escleródios de cada um dos três blocos de cada tratamento. Após 48 h de incubação, a 25 °C, no escuro, efetuou-se a contagem de colônias de *R. solani* emergentes dos fragmentos das folhas lesionadas e a partir de escleródios. As avaliações

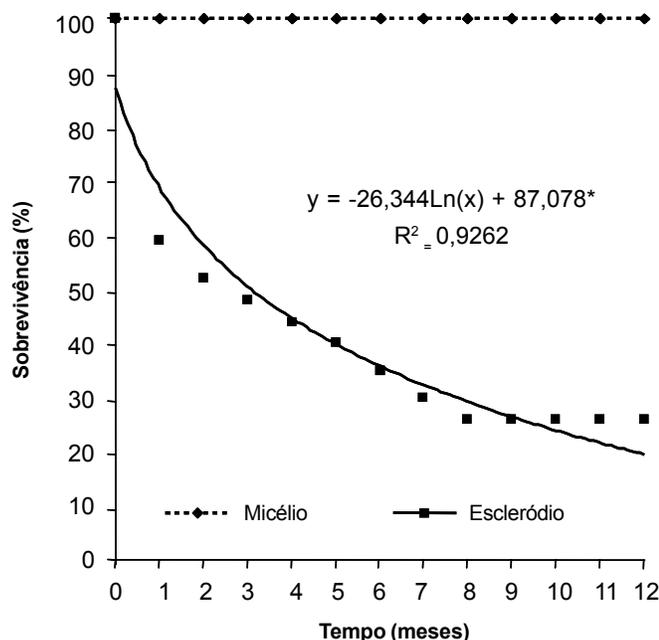
foram realizadas mensalmente, durante 12 meses, de dezembro de 1994 a novembro de 1995. A média das temperaturas máxima e mínima, a aproximadamente 500 m da área experimental foi de 31,37 °C e 9,74 °C, nos meses de janeiro e junho de 1995, respectivamente. A média de insolação diária/mês foi de 11,75 h e a precipitação anual foi de 1102,1 mm, concentrada nos meses de dezembro/94 a março/95 e outubro a novembro/95. A umidade relativa do ar foi de 69,71 a 85,26%.

Em outro ensaio, folhas lesionadas e ramos contendo escleródios de *R. solani* foram imersos, separadamente, em 2 l de suspensão conidial (10<sup>6</sup> conídios/ml) dos isolados UFV-1 (*T. longibrachiatum*) e UFV-2 e UFV-3 (*T. inhamatum*), durante 3 min. Após remoção do excesso de suspensão de inóculo sobre papel-toalha, secções de ramos com escleródios e folhas lesionadas foram colocadas separadamente em saquinhos brancos de náilon. Folhas e secções de ramos, imersos por 3 min, na mistura de captan (1200 ppm) + hipoclorito de sódio (800 ppm de Cl<sub>2</sub>), contendo adjuvante (Extravon a 0,05%) (Silveira *et al.*, 1992) e amostras infestadas sem tratamento com fungicida ou com antagonista, foram analogamente acondicionadas em saquinhos de náilon para servirem como testemunha. Os saquinhos, contendo as amostras, foram mantidos entre restos de ramos e folhas de eucalipto, sob condições de jardim clonal, em Viçosa, MG, no período de 01 a 30/12/1994. Empregou-se o delineamento de blocos casualizados com quatro blocos e cinco repetições. A cada seis dias, avaliou-se a sobrevivência do patógeno, como descrito. A média das temperaturas máxima e mínima, a aproximadamente 500 m da área experimental, foi de 28,63 °C e 18,25 °C. A insolação média diária foi de 6,1 h, sendo a precipitação mensal de 283,5 mm. A umidade relativa do ar foi de 69,7 a 96%.

A sobrevivência de *R. solani* na forma de micélio em folhas lesionadas de eucalipto, aparentemente, não foi afetada por fatores ambientes e tampouco por possíveis antagonistas de ocorrência natural. Ao longo de 12 meses de avaliação, todos os fragmentos foliares plaqueados originaram colônias de *Rhizoctonia* sp. Por outro lado, a sobrevivência dos escleródios decresceu progressivamente, havendo queda brusca na sua viabilidade, atingindo 59% ao final do primeiro mês. Do segundo mês até a última avaliação, a redução na viabilidade dos escleródios foi suave, à taxa mensal de 4 a 7%, atingindo cerca de 26% ao final dos 12 meses (Figura 1).

Boosalis & Scharen (1959) observaram que o micélio deste fungo sobrevive em fragmentos de beterraba, como hifa de coloração marrom-escura e irregularmente ramificada, no interior dos tecidos do hospedeiro por até sete meses após a colheita. Em raízes infestadas de beterraba, *R. solani* AG-2-2 sobreviveu pelo menos por um ano (Ruppel, 1991). Baird (1993) determinou que o fungo pode sobreviver em resíduos do cultivo de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) deixados sobre o solo após a colheita. Neste trabalho, micélio de *R. solani* permaneceu viável por, até, 12 meses em folhas de eucalipto lesionadas.

A maioria dos estudos de sobrevivência de escleródios envolve o enterrio dos mesmos em solos, com resultados variáveis. Manian & Manibhushanrao (1993) determinaram



**FIG. 1** - Sobrevivência de micélio e escleródios de *Rhizoctonia solani* AG1-1C (RH-15), entre restos culturais de eucalipto (*Eucalyptus* spp.). \* Significativo pelo Teste F a 0,5%.

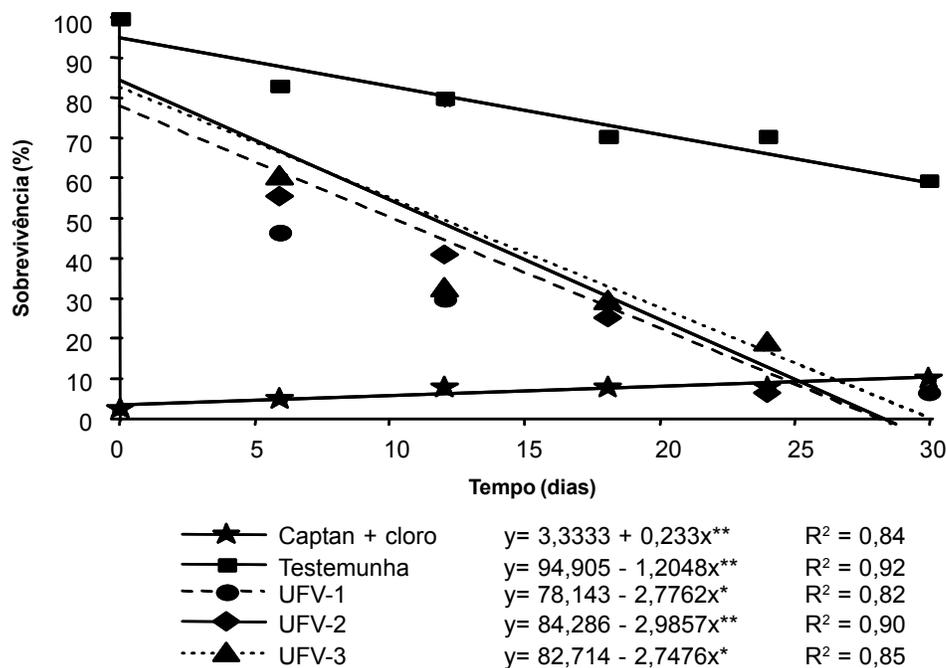
que em solos úmidos, os escleródios foram viáveis por até 21 meses do enterrio, a temperaturas entre 20 e 32 °C. Segundo Gadd & Bertus (1928) citados por Park (1970), escleródios de *R. solani* podem sobreviver até seis anos em solo seco ao ar. Entretanto, quando os escleródios são totalmente expostos ao ambiente, o período de viabilidade é reduzido (Venkatasubbaiah & Safeulla, 1983). Escleródios expostos ao sol durante cerca de 6 h diárias permaneceram viáveis por até 57 dias, dependendo do isolado (Sherwood, 1970). A área de multiplicação clonal onde se instalou o presente ensaio, recebeu, em média, mais de 6 h diárias de sol, exceto nos meses de maio, outubro e novembro de 1995. Entretanto, os restos de ramos e folhas e os próprios saquinhos de náilon evitaram a exposição solar direta nos escleródios. Cerca de 26% dos escleródios permaneceram viáveis nas condições do ensaio, podendo sobreviver por períodos superiores a 12 meses. A germinação de escleródios pode variar com a idade, sendo os mais jovens de maior poder germinativo (Naiki, 1985). Isso pode explicar a redução progressiva na germinação ao longo do experimento. Segundo Bruehl (1987), fungos de solo têm maior capacidade de sobrevivência na forma esclerodial que micelial, contrariamente ao observado neste trabalho. Entretanto, Bruehl (1987) referiu-se a hifas livres no solo, não àquelas no interior de tecidos. Segundo Naiki (1985), quando ocorre falha na germinação de escleródios em meio de ágar-água não significa necessariamente que estejam mortos. O contato com raízes do hospedeiro pode induzir germinação de escleródios que possuem poucas células intactas. Portanto, sobre o hospedeiro, a percentagem de germinação de escleródios de *R. solani* pode ser superior à encontrada, neste trabalho, em ágar-água.

Não se constatou influência dos antagonistas na sobrevivência de *R. solani* na forma micelial. Todos os fragmentos de folhas lesionadas, quando plaqueados, originaram colônias do patógeno. Por outro lado, observou-se redução significativa e contínua na viabilidade de escleródios, equiparando-se ao tratamento fungicida, aos 25 dias após inoculação dos antagonistas, sendo os três isolados igualmente efetivos (Figura 2). Já, a sobrevivência no tratamento com fungicida, atingiu níveis significativamente baixos na primeira avaliação e o fungicida teve sua eficiência reduzida ao longo do período experimental. Sobre os escleródios plaqueados não-germinados, observou-se esporulação de *Trichoderma* sp. Redução progressiva e contínua na sobrevivência de escleródios da testemunha foi também constatada, mas significativamente inferior a quaisquer dos tratamentos.

Segundo Mukherjee *et al.* (1995), *T. harzianum* parasita hifas e escleródios de *R. solani*, sendo mais efetivo no parasitismo das primeiras. O micoparasitismo de *T. harzianum* (Jaffee, 1993) e *T. longibrachiatum* (Melo, 1996) tem sido observado por vários pesquisadores, em hifas de *R. solani*. A inibição do crescimento de *R. solani* ocorre logo após o contato com o antagonista, seguindo-se uma série de eventos de degradação da hifa hospedeira (Benhamou & Chet, 1993). Entretanto, neste trabalho, nenhum dos antagonistas utilizados reduziu a sobrevivência de *R. solani* na forma micelial em folha lesionada. Isso ocorreu, provavelmente, pela incapacidade de *Trichoderma* spp. em hiperparasitar o micélio do patógeno no interior dos tecidos foliares, protegido pelo mesófilo. Aparentemente, não há trabalhos sobre o micoparasitismo de *Trichoderma* spp. sobre micélio de *R. solani*, em tecidos do hospedeiro. O micoparasitismo, sempre que detectado, ocorreu sobre micélio livre, estando este totalmente exposto à ação dos antagonistas.

Ao contrário do encontrado para micélio, os antagonistas reduziram a sobrevivência dos escleródios do patógeno. Esses se encontravam na superfície externa de ramos e folhas de eucalipto, completamente expostos aos antagonistas e sujeitos às oscilações de umidade do ar, temperatura, precipitação pluviométrica e insolação. Acredita-se que as variações de ambiente, especialmente a insolação, podem ter afetado a sobrevivência dos escleródios, uma vez que aqueles não tratados também tiveram sua viabilidade reduzida ao longo do experimento. Segundo Sherwood (1970), 183 horas de insolação direta são suficientes para erradicar escleródios de *R. solani*. A insolação total acumulada foi de 190 h, durante a condução do presente trabalho. Todavia, os saquinhos de náilon contendo escleródios, bem como os restos de cultura sobre os saquinhos, não permitiram sua exposição direta aos raios solares, o que impossibilitou uma avaliação da insolação real nos escleródios.

Têm-se relatado micoparasitismo e outros efeitos antagonísticos de microrganismos do solo sobre a germinação de escleródios e sobrevivência de *R. solani* (Naiki, 1985). Segundo Beagle-Ristaino & Papavizas (1985), *T. viride* Pers., *T. harzianum* Rifai, *T. hamatum* (Bon.) Bain e *Trichoderma virens* (Miller *et al.*) Arx colonizaram escleródios de *R. solani*



**FIG. 2** - Sobrevivência de escleródios de *Rhizoctonia solani* AG1-1C (RH-15), quando tratados com suspensão conidial de *Trichoderma longibrachiatum* (UFV-1) e *T. inhamatum* (UFV-2 e UFV-3), sobre restos culturais de eucalipto (*Eucalyptus* spp.). \* e \*\* = Significativo pelo Teste F a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente.

e, em cinco semanas, reduziram sua viabilidade em até 100%. No presente trabalho, encontrou-se redução significativa na sobrevivência de escleródios de *Rhizoctonia* sp. tratados com suspensão conidial de *T. longibrachiatum* e *T. inhamatum*.

Pelos resultados obtidos, a aplicação de suspensão conidial de *T. longibrachiatum* (UFV-1) e *T. inhamatum* (UFV-2 e UFV-3) sobre restos culturais de eucalipto, pode constituir uma alternativa para reduzir a sobrevivência de escleródios de *R. solani*. O tratamento com suspensão conidial de *Trichoderma* reduziu significativamente a viabilidade dos escleródios, equiparando-se ao tratamento com captan (1200 ppm) + hipoclorito de sódio (800 ppm de Cl<sub>2</sub>). Entretanto, nenhum dos antagonistas, ou mesmo a mistura de fungicida, afetou a sobrevivência de *R. solani* em folhas infetadas, o que mostra a importância de restos de poda de eucalipto como possíveis fontes de inóculo de *R. solani* e a necessidade das podas de limpeza e sua eliminação da área de multiplicação clonal.

Silveira *et al.* (1992) determinaram que a mistura de captan com hipoclorito de sódio teve efeito instantâneo sobre escleródios do patógeno. Errampalli & Johnston (2001) também determinaram o efeito erradicante instantâneo que a imersão de escleródios de *R. solani* em solução de hipoclorito de sódio a 500 ppm por 8 min ou 1.000 ppm por 2 min, proporcionam. Neste trabalho, constatou-se que a mistura captan + hipoclorito de sódio é efetiva no controle do patógeno durante, pelo menos, 30 dias. O ligeiro aumento na recuperação do fungo ao longo do tempo pode ser explicado pela remoção do princípio fungitóxico pela água de chuva no

período experimental, e, também, pela alta degradabilidade do fungicida captan. Além disso, por se tratar de fungicida que atua por contato, não houve erradicação do micélio do patógeno que se encontrava no interior do tecido foliar.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que os isolados de *Trichoderma* spp. não interferem na sobrevivência de *R. solani* em folhas infetadas de eucalipto, porém reduzem a viabilidade dos escleródios do patógeno, equiparando-se ao tratamento com fungicida (captan + cloro).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C., ZAUZA, E.A.V., MAFIA, R.G. & ASSIS, T.F. Clonagem e Doenças do Eucalipto. Viçosa. Editora UFV. 2004.
- BAIRD, R.E. Survival of *Rhizoctonia solani* AG-4 in residual peanut shells in soil. *Plant Disease* 77:973-975. 1993.
- BEAGLE- RISTAINO, J.E. & PAPAVIDAS, G.C. Biological control of *Rhizoctonia* stem canker and black scurf of potato. *Phytopathology* 75:560-564. 1985.
- BENHAMOU, N. & CHET, I. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. *Phytopathology* 83:1062-1071. 1993.
- BOOSALIS, M. & SCHAREN, A.L. Methods for microscopic detection of *Aphanomyces euteiches* and *Rhizoctonia solani* and for isolation of *Rhizoctonia solani* associated with plant debris. *Phytopathology* 49:192-198. 1959.
- BRUEHL, G.W. *Soilborne Plant Pathogens*. New York. Macmillan

Publishing Company. 1987.

ERRAMPALLI, D. & JOHNSTON, H.W. Control of tuber-borne black scurf (*Rhizoctonia solani*) and common scab (*Streptomyces scabies*) of potatoes with a combination of sodium hypochlorite and thiophanate-methyl preplanting seed tuber treatment. Canadian Journal of Plant Pathology 23:68-77. 2001.

JAFFEE, B.A. Density-dependent parasitism in biological control of soil borne insects, nematodes, fungi and bacteria. Biocontrol Science and Technology 3:235-246. 1993.

MANIAN, S. & MANIBHUSHANRAO, K. Influence of some factors on the survival of *Rhizoctonia solani* in soil. Tropical Agriculture 67:207-208. 1993.

MELO, I.S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. Revisão Anual de Patologia de Plantas 4:261-295. 1996.

MENZIES, J.D. The first century of *Rhizoctonia solani*. In: Parmeter, J.R. (Ed.). *Rhizoctonia solani*, Biology and Pathology. Berkeley. University of California Press. 1970. pp.69-92.

MUKHERJEE, P.K., MUKHOPADHYAY, A.N., SARMAH, D.K. & SHRESTHA, S.M. Comparative antagonistic properties of *Gliocladium virens* and *Trichoderma harzianum* on *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* - its relevance to understanding the mechanisms of biocontrol. Journal of Phytopathology 143:275-279. 1995.

NAIKI, T. Population and survival of sclerotia of *Rhizoctonia solani*

in soil. In: Parker, C.A., Rovira, A.D., Moore, K.J., Wong, P.T.W., & Kollmorgen, J.F. (Eds.) Ecology and Management of Soilborne Plant Pathogens. St. Paul. American Phytopathological Society. 1985. pp.51-53.

PARK, D. Survival of microorganisms in soil. In: Baker, K.F. & Snyder, W.C. (Eds.) Ecology of soil-borne plant pathogens. Berkeley. University of California Press. 1970. pp.82-98.

RUPPELL, E.G. Survival of *Rhizoctonia solani* in fallow field soil and buried sugarbeet roots at three depths. Journal of Sugar Beet Research 28:141-153. 1991.

SHERWOOD, R.T. Physiology of *Rhizoctonia solani*. In: Parmeter, J.R. (Ed.). *Rhizoctonia solani*, Biology and Pathology. Berkeley. University of California Press. 1970. pp.69-92.

SILVEIRA, S.F., ALFENAS, A.C., MAFFIA, L.A. & SUZUKI, M.S. Controle químico da queima de folhas e da mela de estacas de eucalipto, causadas por *Rhizoctonia* spp. Fitopatologia Brasileira 28:642-649. 2003.

SILVEIRA, S.F., FERREIRA, F.A. & ALFENAS, A.C. Eficiência de produtos químicos para a erradicação de escleródios de *Rhizoctonia solani* em estacas de eucalipto. Fitopatologia Brasileira 17:223. 1992. (Resumo)

VENKATASUBBAIAH, P. & SAFEEULLA, K.M. Studies on the viability of sclerotia of *Rhizoctonia solani* in the soil. Journal of Coffee Research 13:30-32. 1983.