

OCORRÊNCIA DE PODRIDÕES DO COLMO EM VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR E USO DE AGENTE DE BIOCONTROLE

Márcia Aparecida Cezar ^{1*} Wycleff Hugo Henrique de Sousa Freitas ¹ Ozania Felizardo de Oliveira¹ Roberto Balbino da Silva ²

¹ Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Departamento de Tecnologia Sucroalcooleira (DTS) Av. dos Escoteiros, s/n, Mangabeira VII Distrito Industrial de Mangabeira, João Pessoa-PB, CEP 58055-000

² Associação dos Plantadores de Cana da Paraíba – ASPLAN - PB
*marciaapcezar@gmail.com

RESUMO

As podridões do colmo limitam a produtividade da cana-de-açúcar, devido a inversão da sacarose, diminuindo a pureza do caldo. Atualmente, o manejo é feito a partir de aplicações de fungicidas, no entanto, não existem produtos indicados para todos os patógenos causadores. Desse modo, a utilização do controle biológico pode constituir-se em um método alternativo de controle. Objetivou-se avaliar a ocorrência de podridões em cinco variedades (RB 86 3129, RB 86 7515, RB 92 579, RB 93 1003, RB 00 2754) cultivadas na Paraíba, bem como verificar o efeito “in vitro” de *Metarhizium anisopliae* sobre o patógeno causador de podridão na cana-de-açúcar. O patógeno foi isolado a partir dos colmos de variedades com sintomas de perfuração e podridão. Para o teste de inibição do patógeno, foi utilizado um isolado de *M. anisopliae*. O teste foi realizado em placas de Petri de 90x15 mm, contendo batata-dextrose-ágar, e antibiótico, onde foi inoculado um disco do antagonista de 0,5 cm de diâmetro e levado para uma câmara tipo BOD a 26 ° C. Após cinco dias, as placas foram inoculadas com o patógeno. As avaliações foram realizadas aos 5, 7, 9 e 11 dias, medindo o diâmetro das colônias. No isolamento, verificou-se que o agente da doença pertence ao gênero *Fusarium* sp., que foi detectado em todas as variedades analisadas. O teste de antagonismo “in vitro” proporcionou uma redução de 52,2% no crescimento de *Fusarium* sp. na presença de *M. anisopliae*.

Palavras-chave: *Saccharum officinarum*; doenças; *Fusarium*; Controle biológico.

OCCURRENCE OF STEM ROTS IN SUGARCANE VARIETIES AND USE OF BIOCONTROL AGENTS.

ABSTRACT

Stem rots limit the productivity of sugar cane due to sucrose inversion, decreasing the purity of the broth. Currently, management is based on fungicide applications, however, there are no products suitable for all the pathogens involved. Thus, the use of biological control can be an alternative method of control. The occurrence of rot in five varieties (RB 86 3129, RB 86 7515, RB 92 579, RB 93 1003, RB 00 2754) cultivated in Paraíba State was evaluated. In addition, the "in vitro" effect of *Metarhizium anisopliae* on the pathogen was verified. The pathogen was isolated from the stems of varieties with perforation and rot symptoms. For the pathogen inhibition test, an isolate of *M. anisopliae* was used. The test was performed in 90x15 mm Petri dishes, containing Potato-dextrose-agar, and antibiotic, where a 0,5 cm diameter disk of the antagonist was inoculated, and taken to a DBO chamber at 26°C. After five days, the plates were inoculated with the pathogen. The evaluations were carried out at 5, 7, 9 and 11 days, measuring the diameter of the colonies. In the isolation, it was found that the disease agent belongs to the genus *Fusarium* sp., and it was detected in all varieties analyzed. The in vitro antagonism test provided a 52.2% reduction in the growth of *Fusarium* sp. in the presence of *M. anisopliae*.

Key words: *Saccharum officinarum*; disease; *Fusarium*; Biological control.

1 INTRODUÇÃO

Importância da Cana-de-açúcar

O cultivo da cana-de-açúcar representa uma das principais culturas da economia, praticada em todas as regiões brasileiras, sendo o Sudeste a principal região seguida do Centro-Oeste e Nordeste (IBGE, 2020)

A área colhida de cana-de-açúcar está estimada em 8,48 milhões de hectares, redução de 1,3% se comparada com a safra anterior. Apesar disso, haverá acréscimo de 3,6% na produção de cana-de-açúcar contabilizando 642,7 milhões de toneladas (CONAB, 2020). O Estado de São Paulo, maior produtor nacional, deverá ter uma área colhida 2,8% menor que na última safra.

Na região Nordeste, os maiores estados produtores são Alagoas, responsável por 36,16%, seguido de Pernambuco (24,64%) e Paraíba (10,34%). Neste último, o cultivo da cana-de-açúcar constitui-se no maior produto agrícola produzido (IBGE, 2020), onde se destina predominantemente para a fabricação de etanol, com estimativa de produção de 432,8 milhões de litros, já para o açúcar, a projeção é de 125 mil toneladas produzidas

Problemas fitossanitários na cana-de-açúcar

Diversas pragas e doenças que podem acometer a cultura causando prejuízos aos produtores e consequentemente ao setor sucroenergético. Dentre as inúmeras pragas que atacam a cultura da cana-de-açúcar, na região Nordeste, particularmente no estado da Paraíba, a broca comum (*Diatraea flavipennella*), cigarrinha dos canaviais (*Mahanarva posticata*), broca Gigante (*Telchin licus licus*) e a lagarta Elasm (*Elasmopalpus lignosellus*) são responsáveis por grandes perdas (ASPLAN, 2014).

Os danos causados pela broca comum podem ocorrer de forma direta, como enraizamento aéreo, brotação lateral, perda de peso, quebra e perfuração dos colmos, ou de forma indireta pela penetração de fungos fitopatogênicos, ocasionando podridões no colmo. No complexo broca-podridões, a interação da broca com microrganismos invasores intensifica a formação de metabólitos que afetam negativamente a fermentação alcoólica. Ocorre a inversão da sacarose em glucose, diminuindo a pureza do caldo e o peso do açúcar (GALLO *et al.*, 1988 *apud* DEMETRIO; ZONETTI; MUNHOZ, 2016)

Além das pragas, a cultura da cana-de-açúcar é afetada mundialmente por mais de uma centena de doenças (MATSUOKA, 2016). Até hoje foram identificadas 216 doenças, sendo que cerca de 58 foram encontradas no Brasil. Dentre as doenças, que podem interferir diretamente na qualidade de sacarose, destacam-se a Podridão abacaxi (*Ceratocystis paradoxa* moreau), Podridão vermelha (*Colletotrichum falcatum* Went) e *Pokkah boeng* (espécies do *Complexo Fusarium fujikuroi* – FFSC). Apesar de serem conhecidas, estas duas últimas podridões, ainda são pouco estudadas e sua identificação vem recentemente passando por modificações. Embora apresentem algumas diferenças, ambas as podridões, causam grandes danos na indústria, pois, os colmos e tecidos atacados secam (não havendo caldo para ser extraído), além de que nos tecidos contaminados ocorrer a inversão de sacarose.

Embora a sintomatologia ser bastante utilizada na diagnose de doenças de plantas, no caso das podridões em cana-de-açúcar, não é possível diferenciar quais doenças e respectivos

patógenos ocorrem se baseando somente nesta ferramenta, sobretudo *Pokkah boeng*, na qual, várias espécies estão envolvidas. Outro aspecto importante a ser questionado, é referente a forma adequada de controle das podridões, devido à falta de produtos químicos específicos para todos os patógenos na cana-de-açúcar. Com base na correta identificação dos patógenos, formas alternativas de manejo devem ser estimuladas, como o uso de agentes de biocontrole, que consiste na utilização de agentes biológicos com potencial para interferir nos processos vitais dos fitopatógenos.

Na Paraíba, o agente de biocontrole *Metarhizium anisopliae*, é bastante utilizado no manejo da cigarrinha (*M. posticata*) e sua capacidade antagônica sobre fitopatógenos foi verificada em diversas culturas agrícolas como em feijoeiro, trigo, cana-de-açúcar e bananeira (SASAN; BIDOCHKA, 2013; KEYSER et al., 2014; SIQUEIRA, 2016, PICARDAL et. al. 2019). Diante do exposto objetivou-se verificar a ocorrência de podridões em cinco variedades de cana-de-açúcar cultivadas na Paraíba e avaliar o efeito do agente de biocontrole *M.* sobre os patógenos identificados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida nos Laboratórios de Microbiologia e de Tecnologia Sucroalcooleira do Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional (CTDR), pertencentes à Universidade Federal da Paraíba (UFPB). As variedades utilizadas e o agente de biocontrole foram cedidos pela Associação dos Plantadores de Cana da Paraíba (ASPLAN-PB) e as características de cada variedade estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Características das variedades de cana-de-açúcar avaliadas.

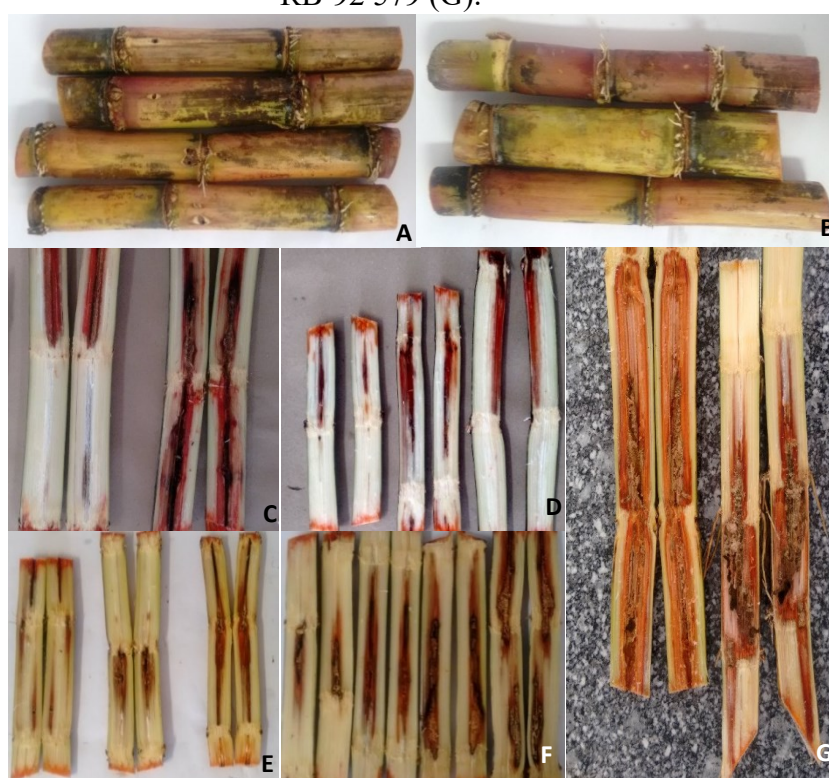
VARIETADES	CARACTERÍSTICAS GERAIS E AGROINDUSTRIAIS
RB 86 3129	Maturação precoce média, médio teor de sacarose, alta produtividade agrícola, tolerante ao estresse hídrico, excelente sanidade e boa brotação em cana-planta e em soqueiras.
RB 86 7515	Desenvolvimento rápido, hábito de crescimento ereto, pouca cera. Alto teor de sacarose e alta produtividade agrícola, responsiva a maturador podendo ser cortada em início de safra. Excelente desempenho em solos de textura arenosa.
RB 92 579	Desenvolvimento lento, colmo de aspecto manchado, pouca cera. Ótimo perfilhamento e brotação de socaria, altíssima produtividade agrícola, elevado ATR (açúcares totais recuperáveis) e rápida recuperação ao estresse hídrico (seca).
RB 93 1003	Rápido desenvolvimento, colmo de aspecto manchado, com pouca cera. Alta produtividade agrícola em diversos estágios de cultivo (planta, soca e ressoca), tolerante à seca.
RB 00 2754	Rápido desenvolvimento, hábito de crescimento ereto, diâmetro do colmo grosso, com muita cera. Alta produtividade, maturação de precoce a média, alto teor de sacarose, médio teor de fibra, baixa restrição de exigências em ambientes.

Fonte: Adaptado de DAROS, OLIVEIRA e BARBOSA (2015).

Isolamento do agente causador de podridões em variedades de cana-de-açúcar

Para a identificação de possíveis agentes causais, utilizaram-se colmos de cana-de-açúcar apresentando ou não sintomas de perfuração e podridão (Figura 1). Foram retirados fragmentos da área limítrofe entre o tecido sadio e o doente, além de fragmentos sadios, utilizados como controle e submetidas ao isolamento indireto de fungos dos tecidos (ALFENAS *et al.*, 2007). Foi feita a desinfestação superficial em álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio 2% por um minuto e lavagem em água destilada esterilizada, dispostos em papel filtro esterilizado para secar, seguido do plaqueamento em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA), acrescido de antibiótico (Tetraciclina) na dose 0,05 g/L. As placas foram mantidas à 27°C, durante sete dias. Após esse período seguiu a identificação com o auxílio de um microscópio óptico para visualização das características morfológicas, tais como estruturas reprodutivas (esporos) e culturais como pigmentação e estrutura do micélio.

Figura 1 – Colmos de cana-de-açúcar com (A) e sem sintomas de perfuração de broca (B), e com podridões RB-86 7515 (C), RB-86 3129 (D), RB-93 1003 (E), RB-00 2754 (F) e RB-92 579 (G).



Teste de antagonismo “in vitro” de *Metarhizium anisopliae* a *Fusarium* sp.

Os ensaios da capacidade antagonica de *Metarhizium anisopliae* ao patógeno previamente identificado no isolamento foram realizados através do cultivo pareado dos

microrganismos “in vitro” em placas de Petri de 90 x 15 mm. Em cada placa de Petri contendo meio de cultura Batata-dextrose-ágar (BDA), acrescido de antibiótico na dose 0,03 g/L foi inoculado um disco de 0,5 cm de diâmetro contendo micélio do antagonista *M. anisopliae*. Após cinco dias de incubação em câmara climatizada tipo B.O.D. a 26°C, um disco (0,5 cm) do fitopatógeno, foi inoculado na outra extremidade da placa, seguindo a metodologia de Siqueira (2016). Após a inoculação dos fungos, as placas foram mantidas em a 26°C por mais 11 dias para a observação do antagonismo. As medidas dos diâmetros das colônias foram realizadas aos 5, 7, 9 e 11 dias após a inoculação do fitopatógeno. O cálculo da porcentagem de inibição (SASAN e BIDOCHKA, 2013) foi feito utilizando a fórmula: $PIC (\%) = [(crescimento \text{ do controle positivo} - crescimento \text{ do tratamento}) \times 100] / Crescimento \text{ do controle positivo}$. Realizou-se a avaliação categórica para o antagonismo, como descrita na Tabela 2.

Tabela 2- Tipo de controle ou antagonismo por categoria.

Categoria	Controle/Antagonismo
A	Sem nenhum controle, o fungo fitopatogênico cresce por cima do <i>M. anisopliae</i> (0);
B	O fungo fitopatogênico cresce até o limite da colônia de <i>M. anisopliae</i> , mas não por cima desta (+);
C	Há a formação do halo de inibição e este se mantém por todo o período de incubação (++);
D	Há o retardo no desenvolvimento micelial do fitopatógeno, mas no fim do período de incubação o mesmo se desenvolve por cima de <i>M. anisopliae</i> (+/-);
E	Total controle, o fungo <i>M. anisopliae</i> cresce por cima do fitopatógeno (X).

Fonte: Bell et al., (1982) com adaptações (SIQUEIRA, 2016)

O delineamento utilizado foi constituído de três tratamentos e seis repetições, distribuídos da seguinte forma: 1: *M. anisopliae* pareado com *Fusarium* sp. (T1); 2 *M. anisopliae* (T2); 3: *Fusarium* (T3). Os dados provenientes das áreas médias das colônias de *M. anisopliae*, *Fusarium* sp. foram submetidos ao teste T com 5% de probabilidade para cada dia de amostragem. Esta abordagem foi realizada a fim de verificar a partir de qual dia o *Metarhizium* sp. passa a afetar o crescimento do *Fusarium* sp

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

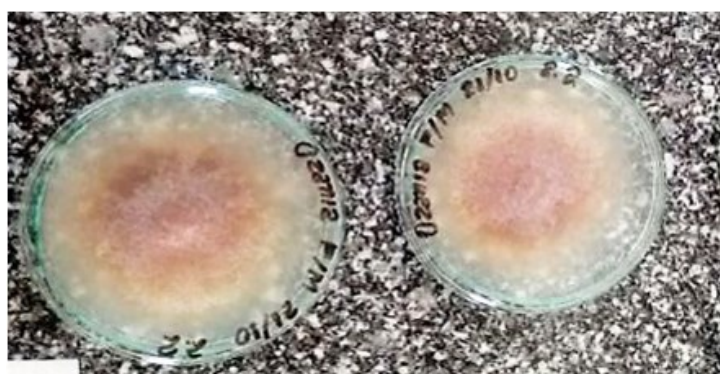
Isolamento do agente causador de podridões em variedades de cana-de-açúcar

Pela sintomatologia apresentada, nas cinco variedades avaliadas, não foi possível identificar qual patógeno estava envolvido na infecção, como pode-se observar na Figura 1. Independente da variedade, ocorreram diversas intensidades na infecção, onde as infecções recentes apresentam o tecido avermelhado e infecções mais antigas apresentavam o tecido vermelho escuro e em estágio de necrose. No entanto, pode-se observar a formação do “complexo broca-podridão”, que é característica da podridão de *Fusarium*.

O Isolamento revelou colônias de crescimento rápido e coloração róseo a púrpura (Figura 2), típicas dos aspectos gerais do gênero *Fusarium* que é caracterizado pelo seu

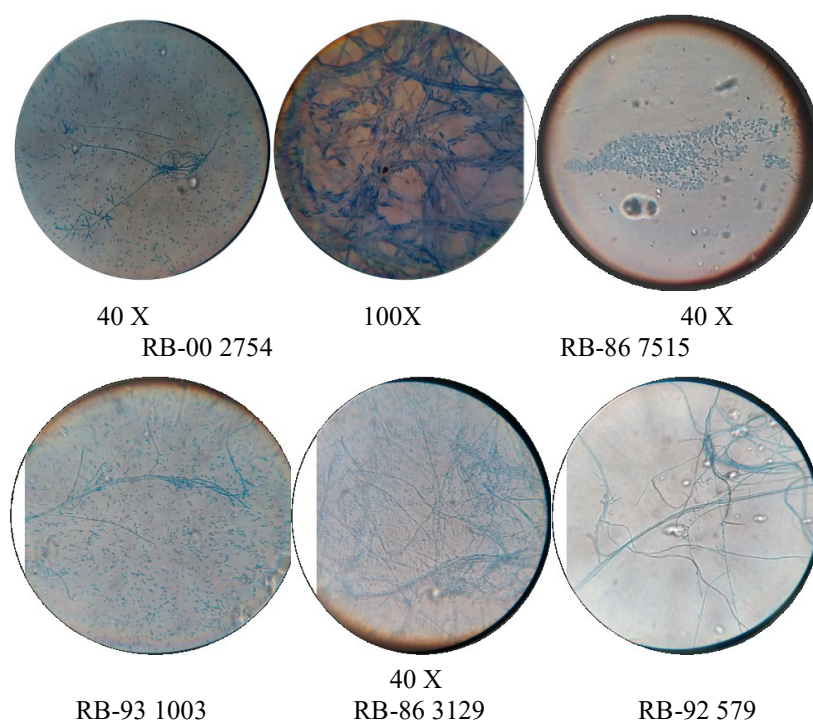
crescimento rápido (sete dias), colônias com coloração pálida ou colorida (violeta à purpura escuro ou do creme à laranja) (DOMSCH et al.,1980).

Figura 2 – Aspectos das colônias obtidas após o isolamento variedade RB-86 7515



Patógenos como *Fusarium* são classificados como necrotróficos, ou seja, destroem os tecidos vegetais por meio da ação de toxinas ou enzimas que promovem a lise e morte da célula hospedeira, permitindo o acesso a nutrientes e o crescimento do patógeno (AGRIOS, 2005). Na cana-de-açúcar ocasiona a podridão do colmo, reduzindo o teor de açúcar nos colmos devido à inversão da sacarose armazenada na planta, e, como consequência ocasiona a contaminação do caldo, prejudicando assim a qualidade dos produtos (DINARDO-MIRANDA, 2008). As características morfológicas das estruturas vegetativas e reprodutivas (esporos), características de *Fusarium* sp. (Figura 3) foram observadas em todas as variedades avaliadas.

Figura 3 - Estruturas de *Fusarium* sp. isolado de cinco variedades de cana-de-açúcar.



A constatação desse patógeno nas cinco variedades, amplamente cultivadas na Paraíba, apontam a necessidade de pesquisas envolvendo alternativas de manejo, uma vez que pode acarretar sérios prejuízos ao produtor e consequentemente à indústria principalmente pela inversão de sacarose, o que diminui o rendimento no processamento da cana. São frequentes os relatos de perdas de 50% a 70 % de sacarose em colmos atacados simultaneamente pelo complexo broca-podridões (SANTIAGO e ROSSETTO, 2010).

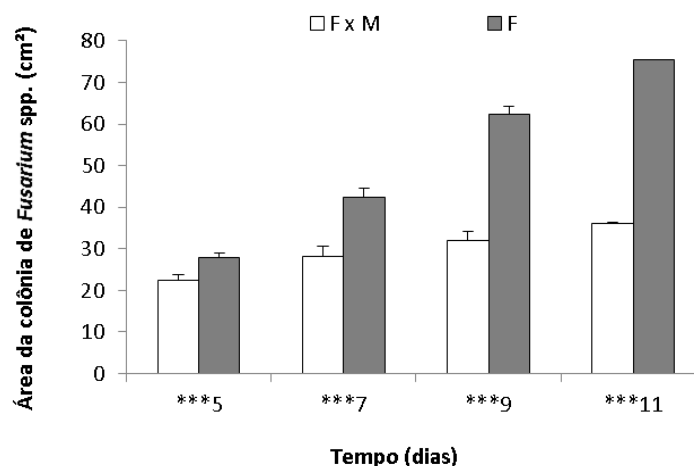
Para o controle químico das podridões em cana-de-açúcar existe até o momento somente um produto registrado para *Colletotrichum falcatum* (MAPA, 2020), contudo, a podridão envolvendo espécies de *Fusarium* sp. podem estar sendo manejadas equivocadamente com o uso de fungicidas não recomendados para a cana-de-açúcar, o que pode resultar futuramente em resistência do patógeno ao produto e permanência no ambiente, haja vista sua ocorrência em todas as variedades.

2 Teste de antagonismo “in vitro” de *Metarhizium anisopliae* contra *Fusarium* spp.

A partir do 5º dia de amostragem, verificou-se significativa redução no diâmetro do patógeno *Fusarium* sp. na presença de *M. anisopliae* (Figura 4). Dados semelhantes do estudo realizado com *Metarhizium robertsii* e o fitopatógeno, *Fusarium solani*, causador da podridão da raiz de feijão demonstrou a formação de uma pequena zona de inibição “in vitro” (SASAN e BIDOCHKA, 2013). O antagonismo das espécies *M. brunneum*, *M. robertsii* e *M. flavoviridae* ao fitopatógeno *Fusarium culmorum* proporcionou diferentes tamanhos de zona de inibição (KEYSER et al., 2014).

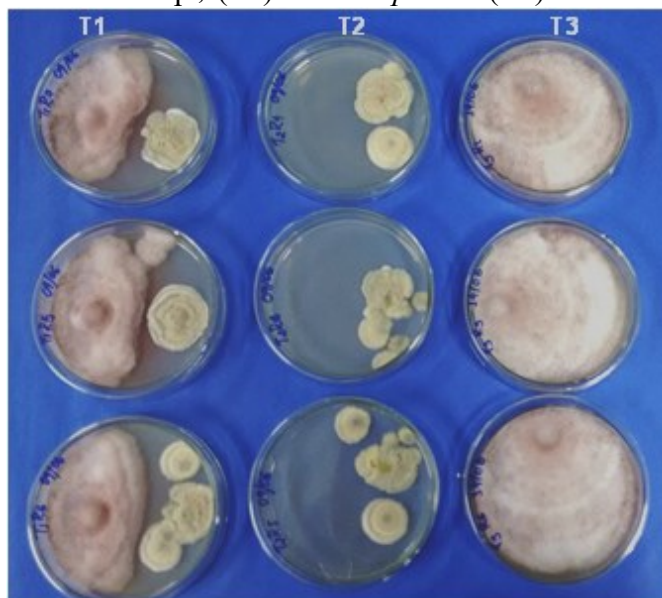
No último dia de amostragem, verificou-se a inibição de 52.2 % (desvio padrão = 1.5%) de *Fusarium* spp. na presença de *Metarhizium* sp. Resultado semelhante obtido na avaliação do antagonismo de diferentes isolados de *Metarhizium* spp. sobre os fitopatógenos *Colletotrichum falcatum* e *F.* provenientes da cana-de-açúcar demonstrou que todas as espécies de *Metarhizium* inibiram o crescimento dos fitopatógenos, destacando-se *M. robertsii*, com 54% de inibição (SIQUEIRA, 2016).

Figura 4 – Efeito antagônico do *Metarhizium anisopliae* contra o *Fusarium* sp. (FxM em branco) e o seu respectivo controle (F em cinza). Teste T: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.



Ao término do experimento “in vitro”, a avaliação categórica do antagonismo indicou tratar-se da Categoria C, na qual, há a formação do halo de inibição, e esse se manteve por todo o período de incubação (Figura 5).

Figura 5 – Pareamento e inibição de *Fusarium* sp. por *Metarhizium anisopliae* (T1) *M. anisopliae* x *Fusarium* sp.; (T2) *M. anisopliae* e (T3) *Fusarium* sp.



Desta forma, pesquisas que envolvam práticas alternativas como a utilização de microrganismos antagonistas, são de suma importância, pois não contaminam o ambiente tampouco o aplicador e devem ser estimuladas. No Brasil são poucos os estudos que utilizam *Metarhizium* sp. no controle de doenças, contudo, para o controle de podridões em cana-de-açúcar, surgem como uma expectativa, principalmente pela falta de variedades resistentes aliado ao controle químico pouco específico.

4 CONCLUSÕES

O fungo *Fusarium* sp. ocorreu nas cinco variedades de cana-de-açúcar avaliadas, demonstrando alta suscetibilidade ao patógeno. Não foram encontradas estruturas morfológicas (vegetativas ou reprodutivas) de *Colletotrichum falcatum*. O agente de biocotrole *Metarhizium anisopliae* inibiu o crescimento micelial de *Fusarium* sp.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. Plant Pathology. Ed. 5, Elsevier, 2005, San Diego.

ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A.; MAFIA, R. G.; GONÇALVES, R. C. Isolamento de fungos patogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Eds.). **Métodos em Fitopatologia**. 2. ed, Viçosa, MG: Ed. UFV, 2007. cap. 2, p. 53-91.

ASSOCIAÇÃO DE PLANTADORES DE CANA DA PARAÍBA – ASPLAN. Técnicas agrícolas sustentáveis para o cultivo da cana-de-açúcar. (Manual de Orientação). João Pessoa, PB, 2014.

BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. "in vitro" antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, p. 397-382, 1982.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. V. 6 – Safra 2019/20, n. 4, quarto levantamento, Brasília, 2020. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>>. Acesso em: 20 de abril de 2020.

DAROS, E.; OLIVEIRA, G. A. de; BARBOSA, G. V. de. (Org.). 45 anos de variedades RB de cana-de-açúcar: 25 anos de Ridesa. Curitiba: Ed. Graciosa, 2015.

DEMETRIO, P.A.; ZONETTI, P.C.; MUNHOZ, R.E.F. Avaliação de clones de cana-de-açúcar promissores RBs quanto à resistência à broca-da-cana (*diatraea saccharalis*) na região noroeste do Paraná. CESUMAR, Maringá, 2008, v. 10, n.1, p. 13-16.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; Pragas. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, G. A. (Eds.). **Cana-de-açúcar**, Campinas: Instituto Agrônômico, cap. 17, p. 349-404, 2008.

DOMSCH, K. H; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of soil fungi**. Academic Press, 1980, New York.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção agrícola municipal. <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado>. Acesso em: 24 de abril de 2020.

KEYSER, C. A.; THORUP-KRISTENSEN, K.; MEYLING, N.V. *Metarhizium* seed treatment mediates fungal dispersal via roots and induces infections in insects. **Fungal Ecology**, London, v. 11, p. 122-133, 2014.

MATSUOKA, S. Manejo de doenças e medidas de controle. In: SANTOS, F.; BORÉM, A. (Eds.). **Cana-de-açúcar: do plantio à colheita**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2016. cap. 5, p. 108-138.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. **Agrofit**, Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em 20 abril de 2020.

SANTIAGO, A. D.; ROSSETTO, R. Doenças fúngicas. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_79_22122006154841.html>. Acesso em: 20 de abril de 2020.

SASAN, R. K.; BIDOCHKA, M. J. Antagonismo of the endophytic insect pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* against the bean plant pathogen *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.35, n. 3, p. 288-293, 2013.

SIQUEIRA, A. C. O. **Uso de *Metarhizium* spp. Na produção de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar e seus efeitos na planta, em pragas e doenças.** Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ, Piracicaba, 94p, 2016.

PICARDAL, J. P.; TUNDAG, E. D. L.; PICARDAL, M. T.; GOC-ONG, G. B. Antagonistic activity of *metarhizium anisopliae* (metschnikoff) against phytopathogenic *fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (schlecht.) as a biological control. **CNU Journal of Higher Education** V.13, p 25-33, 2019.