

Controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* e promoção de crescimento em feijoeiro

Biological control of Sclerotinia sclerotiorum and growth promotion in bean plant

LUIS CARLOS FERREIRA RODRIGUES

Discente de Agronomia (UNIPAM)
E-mail: luiscfr@unipam.edu.br

WALTER VIEIRA DA CUNHA

Professor orientador (UNIPAM)
E-mail: walter@unipam.edu.br

Resumo: A diversidade de patógenos nos solos brasileiros é uma condição limitante à produção agrícola. Entre estes podemos destacar o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, que é agente causal do mofo branco e que, por apresentar estruturas de resistência, dificulta o seu controle. O emprego de agentes biocontroladores como *Trichoderma* e *Coniothyrium* tem se tornado uma promissora estratégia no manejo da doença. O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de *Trichoderma* spp. e *C. minitans* na promoção de crescimento e controle de mofo branco *in vitro* e *in vivo* na cultura do feijão. Avaliou-se a germinação de escleródios e competitividade e em casa de vegetação os vasos contendo solo foram corrigidos nutricionalmente e infestados com *S. Sclerotiorum*. Posteriormente, foi realizada a aplicação dos agentes biocontroladores e realizada a semeadura de feijão. Para avaliar a incidência da doença nas plantas foram atribuídas notas de severidade da doença e percentual de mortalidade. Foram avaliadas massa de matéria seca da parte aérea, raiz, área foliar e redução da quantidade de escleródios na área. Os isolados mostraram-se capazes de controlar mofo branco; os agentes biocontroladores apresentaram inibição de germinação de escleródios entre 13 a 60%, e em 60 e 70% para crescimento micelial. Os isolados apresentaram índices de crescimento de 223,94% a 1104,32% em relação ao controle negativo. Em propágulos na área, os isolados *C. minitans* e T.001 obtiveram menores índices de escleródios totais viáveis no solo, sendo essa redução em 53,57% e 57,55% respectivamente. Os isolados demonstraram potencial para promoção de crescimento em feijoeiro e controle de *S. sclerotiorum*.
Palavras-chaves: Mofo branco. *Phaseolus vulgaris*, L. Biocontrole.

Abstract: The diversity of pathogens in Brazilian soils is a limiting condition for agricultural production. Among these, we can highlight the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, which is the causal agent of white mold and that, by presenting resistance structures, makes its control difficult. Biocontrol agents such as *Trichoderma* and *Coniothyrium* have become a promising strategy in disease management. This work aimed to evaluate the use of *Trichoderma* spp. and *C. minitans* in growth promoting and white mold controlling *in vitro* and *in vivo* in bean cultivar. Sclerotia germination and competitiveness were evaluated. In a vegetation house, the vases containing soil were nutritionally corrected and infested with *S. Sclerotiorum*. Subsequently, the application of biocontrol agents and sowing of beans were carried out. The biological control agents were then applied and the beans were sown. Disease severity and percent mortality were assessed to evaluate disease incidence on the plants. The dry mass of the aerial part, the root, the leaf area,

and the reduction of the number of sclerotia in the area were evaluated. The isolates were able to control white mold; the biocontrol agents showed inhibition of germination of sclerotia between 13 and 60% and in 60 and 70% for mycelial growth. The isolates showed growth rates of 223.94% to 1104.32% compared to the negative control. In propagules in the field, the isolates *C. minitans* and T.001 obtained lower rates of total viable sclerotia in the soil, this reduction being 53.57% and 57.55% respectively. The isolates showed potential for growth promotion in bean and control of *S. sclerotiorum*

Keywords: White mold. *Phaseolus vulgaris*, L. Biocontrol.

1 INTRODUÇÃO

O agente causal do mofo branco *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary é um fungo que pertence ao Filo Ascomycota, Classe Leotiomycetes, ordem Helotiales, Família Sclerotinaceae, Gênero *Sclerotinia* (INDEX FUNGORUM, 2022). Como demonstrado por Campos *et al.* (2017), a doença causada por esse fitopatógeno vem assumindo grande importância devido à utilização de sementes infectadas, além de diversos fatores ligados a sucessões de culturas suscetíveis como caso do *Phaseolus vulgaris*, L.

A planta se torna mais vulnerável no período de plena floração ao início de formação de vagens. Os sintomas do mofo branco ocorrem nas vagens, hastes, caules e folhas, causando lesões pequenas e aquosas. De acordo com Barro *et al.*, (2019) com o desenvolvimento da doença, as partes afetadas perdem a cor, tornam-se amareladas e marrons, produzindo podridão mole nos tecidos. As lesões geralmente se desenvolvem em tecidos necróticos onde aparecem manchas de micélio cotonoso, que é o sinal agudo de plantas infectadas por *S. sclerotiorum* (FAGUNDES-NACARATH *et al.*, 2018).

Pannullo *et al.* (2018) demonstraram que o uso de fungicidas é utilizado como manejo, impedindo o estabelecimento de *S. sclerotiorum* no tecido vegetal, no entanto o controle pode ser inconsistente devido às dificuldades em obter boa cobertura de pulverização. Em decorrência disso, o emprego de bioprodutos tem se mostrado uma alternativa para diminuir o uso de agroquímicos e melhorar as estratégias de manejo.

Vários microrganismos são mencionados como agentes eficazes no biocontrole de doenças causadas por *S. sclerotiorum*, por exemplo, os fungos *Coniothyrium minitans* e *Trichoderma* spp. (JAJOR *et al.*, 2017). *Trichoderma* spp. atua no controle de doenças por apresentar inúmeras estratégias de sobrevivência, como rápido crescimento vegetativo, oportunista e competitivo no ambiente (BUTT, 2000).

Coniothyrium minitans é um fungo que apresenta potencial de micoparasitário para algumas espécies de *Sclerotinia*. Como demonstrado por Boland *et al.* (1997), eles parasitam escleródios e hifas de *S. sclerotiorum*. Por apresentar esse potencial antagônico, vem instigando vários países a desenvolverem produtos comerciais como agente de controle biológico (JONES *et al.*, 1970).

Trichoderma spp. possui capacidade de reduzir a sobrevivência, infecção ou crescimento dos patógenos devido aos mecanismos de biocontrole que o gênero detém, como antibiose quando da produção de compostos difusos (antibióticos); competição quando suprime a capacidade de crescimento do patógeno; micoparasitismo em que o

Trichoderma spp. obtém nutrientes de células do patógeno e indução de resistência sendo resposta da planta em função da infecção do patógeno (BENÍTEZ *et al.*, 2004).

Sendo assim, justifica-se a necessidade de pesquisas envolvendo a tecnologia de uso desses biocontroladores com atributos benéficos, como promoção de crescimento e controle de fitopatógenos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso de *Trichoderma* spp. e *C. minitans* na promoção de crescimento e controle de mofo branco em plantas de feijão.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado na empresa NOAA Ciência e Tecnologia LTDA., situada no município de Patos de Minas (MG), Rodovia BR 365, Km 428, nas coordenadas geográficas 18°44'01" latitude sul e 46°40'10" longitude oeste.

2.2 ORIGEM DOS ISOLADOS DE *TRICHODERMA* SPP. E *CONIOTHYRIUM MINITANS*

O isolado de *Trichoderma* sp. e o *Coniothyrium minitans* foram fornecidos pela NOAA Ciência e Tecnologia Agrícola, localizada em Patos de Minas (MG), os quais fazem parte do acervo de pesquisa da empresa. Os isolados encontram-se armazenados pelo método de preservação de Castellani (CASTELLANI, 1967). Os demais fungos como *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma harzianum* são ingredientes ativos de produtos comerciais registrados na agricultura.

Nos testes *in vitro*, foram utilizados discos de micélio contendo estruturas propagativas dos fungos. Para isso, em placas de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA), foram depositadas 10 µl do acervo original do isolado de T.001 e *C. minitans* mantidas a 25 ± 2°C em BOD até completa colonização por toda superfície da placa.

Para os isolados de *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma harzianum*, foi realizado o isolamento dos microrganismos que compõem os produtos comerciais. Para isso, o método utilizado foi o de diluição seriada seguida de plaqueamento em meio de cultura BDA + Triton, para visualização das unidades formadoras de colônias (UFC). Dessa forma, 10g do produto comercial são adicionados em 90 mL em solução salina (0,85%) + Polissorbato 80% a (1%). O plaqueamento é realizado após as amostras ficarem em agitação a 90 rpm durante 60 minutos. As placas foram incubadas a 25± 2°C em BOD por 72 horas. Para obtenção do isolado puro após esse período foi realizada a repicagem das estruturas propagativas dos fungos em placas de Petri, contendo meio BDA e, novamente, incubadas até a completa colonização da superfície da placa.

Para o ensaio em casa de vegetação, foram utilizados produtos comerciais à base de *T. asperellum* e *T. harzianum*. Para os isolados de *Trichoderma* sp. e *C. minitans*, foram utilizados os produtos formulados pela NOAA. A aplicação de ambos os produtos foi realizada no sulco de plantio padronizando a concentração de 1x 10¹² UFC ha⁻¹ de ambos os produtos.

2.3 ORIGEM DO ISOLADO *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM*, AGENTE CAUSAL DO MOFO BRANCO

O fitopatógeno *S. sclerotiorum* foi fornecido pelo Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento da empresa NOOA Ciência e Tecnologia Agrícola, localizada em Patos de Minas (MG). Nos testes *in vitro*, foram utilizados discos de micélio e escleródios para confronto direto com os isolados de *Trichoderma* spp. e *C. minitans*, e para os testes *in vivo* foram usados discos de micélio para colonização do substrato (arroz), utilizado como fonte de inóculo no solo.

Para obtenção dos discos de micélio, em placas de Petri contendo meio de cultura BDA, depositou-se um disco de micélio com cerca de 8 mm de diâmetro do acervo original e mantidas a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ em B.O.D, até completa colonização do patógeno por toda superfície da placa.

Para aquisição dos escleródios, produziu-se meio de fubá e cenoura na proporção de 20g de fubá para 80g de cenoura, autoclavados a 121°C por 30 minutos. Após o resfriamento do substrato, foram acrescentados 10 discos de 8mm de diâmetro contendo estruturas propagativas do fitopatógeno *S. sclerotiorum*. A incubação ocorreu em temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ por aproximadamente 20 dias; a partir dessa fase, a escassez de nutriente e espaço induz a produção dos escleródios. Posteriormente, após a produção dos escleródios, eles foram lavados em água destilada e depositados em papel filtro absorvente até a completa secagem, processo este realizado em câmara de fluxo laminar. Os escleródios foram armazenados em $\pm 4^\circ\text{C}$.

Para o ensaio em casa de vegetação, o inóculo de *S. sclerotiorum* foi feito em grãos de arroz. Para isso, o arroz ficou submerso em água por 30 minutos. Após esse tempo, a água é retirada totalmente e aproximadamente 200 g de arroz é transferido para sacos plásticos e esterilizados por 30 minutos. Após o resfriamento do substrato, 10 discos de micélio de *S. sclerotiorum*, crescidos como descritos anteriormente, foram incorporados ao substrato, mantido à temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa entre 70-80%, em sala de crescimento. A cada dois dias, os sacos contendo o substrato e o fungo foram revolvidos para entrada de oxigênio e para a obtenção de uma colonização uniforme e viável em todo o substrato.

2.4 POTENCIAL ANTAGÔNICO DE *TRICHODERMA* SPP. E *CONIOTHYRIUM MINITANS*

2.4.1 Supressão do crescimento de *S. sclerotiorum*

Para a determinação da atividade antagonista, foram avaliados os microrganismos *C. minitans*, *T. harzianum*, *T. asperellum* e o isolado de *Trichoderma* sp. NOOA (T.001). O teste de antagonismo realizado foi o de confronto direto, utilizando o método de culturas pareadas, descrito por Dennis e Webster (1971). Para isso, um disco de micélio de 8mm de diâmetro do fitopatógeno, crescido em meio BDA é depositado em uma das extremidades da placa de Petri a 5mm da borda. Posteriormente, um disco

de 8mm contendo estruturas propagativas das estirpes antagonistas foram depositadas na outra extremidade da Placa de Petri.

As placas foram mantidas a 25 °C por 7 dias e, após esse período, foi avaliado o crescimento micelial dos fungos sobre a superfície da placa, considerando a porcentagem de crescimento do fitopatógeno e o potencial antagônico dos agentes de biocontrole sobre as estruturas do *S. sclerotiorum*. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições, considerando-se cada placa uma unidade experimental.

2.4.2 Inibição da germinação de escleródios de *S. sclerotiorum*

Para avaliação quanto ao potencial antagônico na germinação dos escleródios, eles foram desinfetados superficialmente, por imersão em álcool 70% (v/v) por 2 min., em solução de hipoclorito de sódio 1% por 2 min. e tríplice lavagem com água destilada estéril. Uma vez secos em papel de filtro, foram transferidos 4 escleródios por repetição em cada Placa de Petri com meio BDA e incubados a 22 °C por sete dias, sendo utilizados como controle.

Para os demais tratamentos, os escleródios restantes foram imersos por 30 segundos em suspensões de *Trichoderma* spp. e *C. minitans* na concentração de 1×10^{12} UFC ha⁻¹, padronizando a recomendação de uso dos produtos comerciais. Como controle positivo, foi utilizado o fungicida comercial (Tiofanto-metílico 350g/L + fluazinan 52,50g/L) na dose de 430 mL de p.c./ 100 kg de sementes, concentração vide fabricante. Após esse período, os escleródios foram depositados em papel filtro absorvente estéril, para absorção, e os mesmos depositados, 4 escleródios por tratamento/repetição, em meio de cultura BDA, como descrito para o tratamento controle, submetidos aos mesmos procedimentos descritos anteriormente.

Após o período de sete dias, foi avaliado o número de escleródios germinados e/ou colonizados por *Trichoderma* spp. /*C. minitans*. O experimento foi realizado em DIC com cinco repetições, considerando-se cada placa uma unidade experimental. Os números de escleródios germinados e/ou colonizados foram convertidos para valores percentuais.

2.5 REDUÇÃO DA TAXA DE INÓCULO DE ESCLERÓDIOS

Para avaliação quanto ao potencial antagônico na redução da quantidade de escleródios na área de plantio aos 50 dias após semeadura (DAS), os vasos contendo 3 kg de solo foram peneirados com o auxílio de uma peneira granulométrica de 20 msh para separação dos escleródios. Após a separação, eles foram pesados em balança de precisão para determinação do peso por unidade experimental. Após pesagem, foi feita uma amostra composta por tratamento e separados 20 escleródios para determinação da viabilidade.

Para análise de viabilidade, eles foram desinfetados superficialmente, por imersão em álcool 70% (v/v) por 2 minutos, em solução de hipoclorito de sódio 1% por 2 minutos e tríplice lavagem com água destilada estéril. Uma vez secos em papel de filtro, os escleródios foram transferidos para o meio BDA e incubados a 22°C por sete

dias; o experimento foi realizado em DIC com cinco repetições e quatro escleródios por tratamento/repetição, considerando-se cada placa uma unidade experimental. Os números de escleródios germinados foram convertidos para valores percentuais.

A quantidade de escleródios totais viáveis na área é a diferença entre o peso (g) por unidade experimental e a viabilidade de germinação dos escleródios (%), utilizando a seguinte fórmula: % de escleródios viáveis na área = peso total unid. Exp. - % viabilidade.

2.6 MANEJO DO MOFO BRANCO E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM CASA DE VEGETAÇÃO

Vasos plásticos de 3 L de capacidade foram preenchidos com 3kg de solo, artificialmente infestado 2% p/v do arroz colonizado com o patógeno e adubado com 2 g de MAP [10% a 12% de Nitrogênio (N) amoniacal e 50% a 54% de P₂O₅ (fósforo)]. Em seguida, foram aplicados 100 mL de solução micronutriente (1,807 g de H₃BO₃, 2,405 g de CuSO₄.5H₂O, 2,926 g de FeCl₃.6H₂O, 5,141 g de MnCl₂.4H₂O, 0,134 g de NaMoO₄.2H₂O e 6,862 g de ZnSO₄.7H₂O diluídos em 13 L de água) e, por fim, o solo foi irrigado com 400 mL de água.

O solo foi incubado por meio de câmara úmida por 7 dias antes da semeadura, para colonização do patógeno no solo. Após incubação, para a semeadura foi realizado um sulco de plantio na parte central do vaso, com aproximadamente 2 cm de profundidade, e colocadas quatro sementes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) cv. Pérola por vaso.

Os produtos à base de *Trichoderma* spp e *C.minitans* foram aplicados na concentração de 1x10¹² UFC ha⁻¹ no sulco de plantio, com auxílio de pulverizador de compressão. Como controle positivo, foi realizado o tratamento de semente com o fungicida Tiofanato-metílico + fluazinam, na dose de 430 mL de p.c./ 100 kg de sementes, concentração vide fabricante. O tratamento sem aplicação onde foi depositado apenas estruturas do fitopatógeno foi considerado controle negativo.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação climatizada à temperatura de 25 ± 2°C e umidade relativa 60%, irrigadas diariamente. O desbaste foi realizado após emergência das plântulas, deixando uma planta por vaso. O experimento foi conduzido por 50 dias, período no qual foi realizada avaliação da incidência de doença e variáveis de crescimento. O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados DBC com 10 repetições, considerando-se cada vaso uma unidade experimental.

2.7 INCIDÊNCIA DE DOENÇA

Para avaliação da incidência da doença, foi utilizado o método qualitativo de acordo com a incidência de sintomas do mofo branco; foram contabilizados o número de plantas mortas e dividido pelo número total de plantas, e o resultado obtido foi transformado em porcentagem equivalente à mortalidade por tratamento. A severidade da doença foi realizada semanalmente por meio da escala de doenças (COTXARRERA *et al.*, 2002).

2.8 FITOMASSA SECA

Para determinação de fitomassa seca da raiz e parte aérea, cada uma dessas partes foram acondicionadas separadamente em sacos de papel e submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar a 70° C por um período médio de 72 h até a obtenção de peso constante. Posteriormente, foi determinado o peso seco utilizando balança de precisão.

2.9 ÁREA FOLIAR

A área foliar foi avaliada pelo método da massa seca dos discos foliares, aos 50 dias após a semeadura. Foram retirados discos foliares de diferentes posições das folhas, por meio de um cilindro de área conhecida. A área foliar foi estimada através do peso seco dos discos e das folhas, utilizando a seguinte fórmula:

$$AF = \frac{(PSF + PSD) \times 15}{PSD}$$

Sendo:

- AF: área foliar
- PSF: peso seco de folha
- PSD: peso seco de discos

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

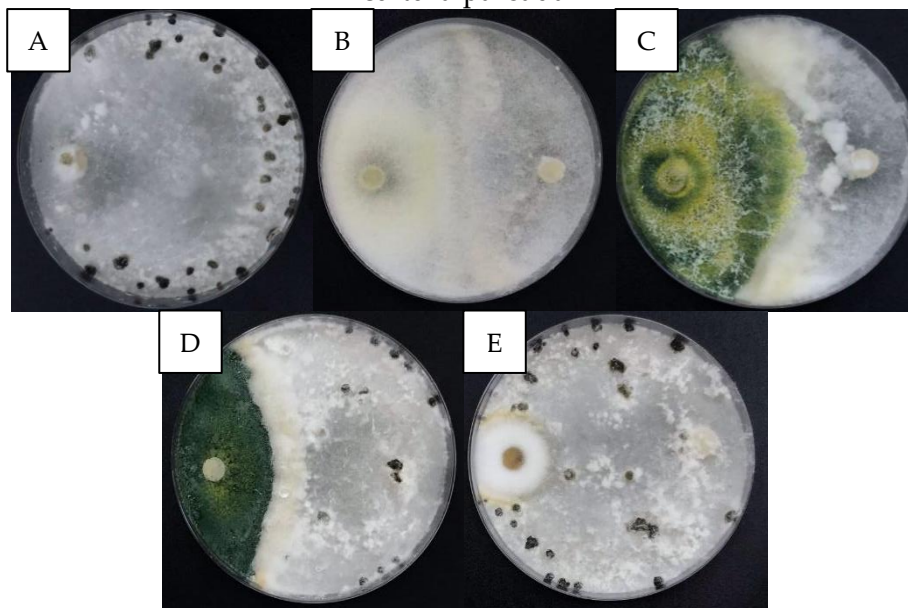
Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de significância. As análises foram realizadas utilizando pacote estatístico do programa SISVAR (FERREIRA, 2010).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 SUPRESSÃO DO CRESCIMENTO DE *S. SCLEROTIUM* IN VITRO

O efeito antagonico foi verificado por meio de culturas pareadas, determinando o crescimento de *S. sclerotiorum* em função da presença de agentes de biocontrole. Verificou-se que o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* em direção às colônias de algumas cepas dos fungos biocontroladores (Figura 1B, 1C e 1D) apresentou interação antagonica ao crescimento do fungo *S. sclerotiorum*. Para o *C. minitans*, não houve supressão do crescimento e produção de escleródios do fitopatógenos em placa (Figura 1E). Além disso, verificou-se o potencial em retardar a produção de escleródios *in vitro* para os isolados (Figura 1B e 1C).

Figura 1: Interações antagonistas entre fungos biocontroladores e *S. sclerotiorum* por cultura pareada

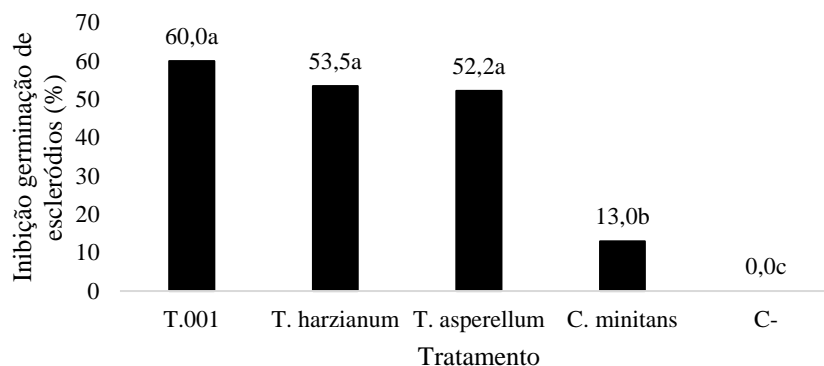


Em (A), *S. sclerotiorum*; em (B), T.001; em (C), *T. harzianum*; em (D), *T. asperellum*; em (E), *C. minitans*.

De acordo com Juliatti *et al.* (2019), testes antagonistas em placa são relevantes para o quesito de seleção de isolados de biocontrole por apresentar fatores ambientais controlados, como luz, umidade, disponibilidade de nutriente e temperaturas. Nesse contexto, avalia-se apenas a interação entre ambos os microrganismos sem que haja a interferência de fatores externos inerente ao ambiente.

A inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* variou significativamente entre os isolados testados. Houve uma redução no crescimento de *S. sclerotiorum* entre 52,2 a 60% quando em contato com antagonista *Trichoderma spp.* Por outro lado, o isolado *C. minitans* exibiu capacidade inibitória sobre o fitopatógeno em 13% quando se comparado com o controle negativo (Figura 2).

Figura 2: Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* *in vitro*



As barras representam valores médios ± Desvio Padrão de cinco repetições. Valores médios acompanhados por letras diferentes são significativamente diferentes pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade. C-: controle negativo (sem presença de agente antagonista).

A supressão do crescimento do fitopatógeno em presença de *Trichoderma* spp. pode ser atribuída à eficácia em competir por espaço, nutrientes e luz, o que lhe confere vantagens sobre alguns patógenos (HARMAN, 2006). De acordo com Bomfim *et al.*, (2010), esse fungo dispõe de elevada capacidade de produção de enzimas hidrolíticas, as quais produzem antibióticos e metabólitos secundários capazes de inibir o crescimento micelial de patógenos.

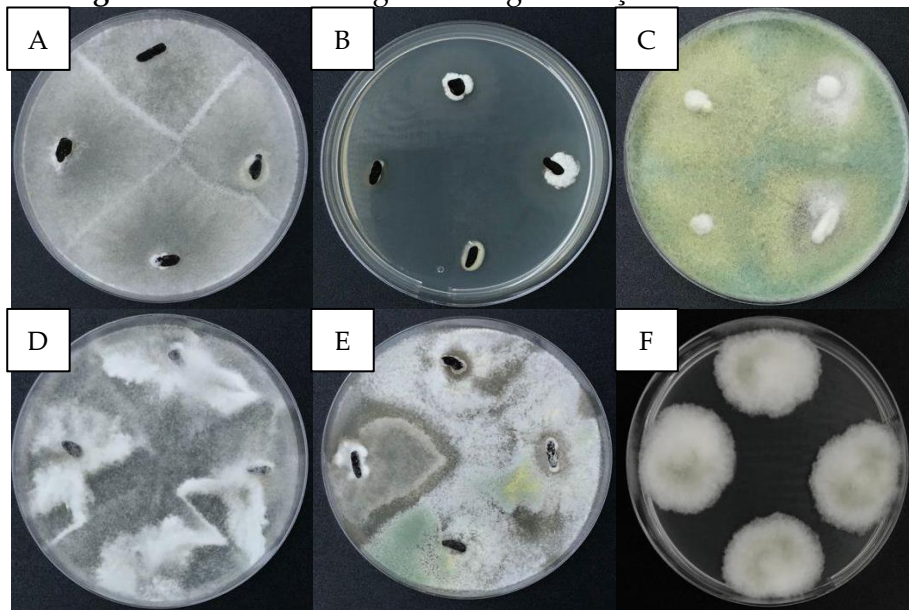
O micoparasitismo como demonstrado por Benítez *et al.*, (2004) é a capacidade do *Trichoderma* de obter nutrientes por meio da colonização das células do patógeno; processo ocorre por meio de ação enzimática, como proteases, glucanases e quitinases, que atuam na degradação da parede celular, levando o patógeno à morte. Estudos mostram a eficiência de *Trichoderma* no controle de fitopatógenos em diferentes culturas, no entanto, por atuarem de forma preventiva, devem estar presentes ou ser aplicados no solo antes da ocorrência da doença (LUCON, 2016).

O micoparasitismo é um dos mecanismos consideráveis de controle de *C. minitans* contra *S. sclerotiorum.*, com potencial de penetrar nas estruturas de resistência tanto do fitopatógeno quanto dos escleródios e hifas (HAN *et al.*, 2010). Sendo assim, explica-se a baixa inibição de crescimento micelial do fitopatógeno, uma vez que o ele apresenta crescimento lento quando comparado com a *S. sclerotiorum*, expressando-se na baixa capacidade inibitória *in vitro* por meio de culturas pareadas.

3.2 INIBIÇÃO DA GERMINAÇÃO DE ESCLERÓDIOS DE *S. SCLEROTIORUM*

O efeito antagônico foi verificado por meio de determinação da germinação de escleródios de *S. sclerotiorum* e por meio de crescimento micelial dos fungos de biocontrole sobre as estruturas de resistência. Verificou-se a inibição da germinação na presença de *Trichoderma* e *C. minitans* (Figura 3C, 3D, 3E e 3F). Para o fungicida comercial, notou-se retardo no crescimento micelial, porém não impediu a germinação do escleródio (Figura 3B).

Figura 3: Potencial antagonístico na germinação dos escleródios

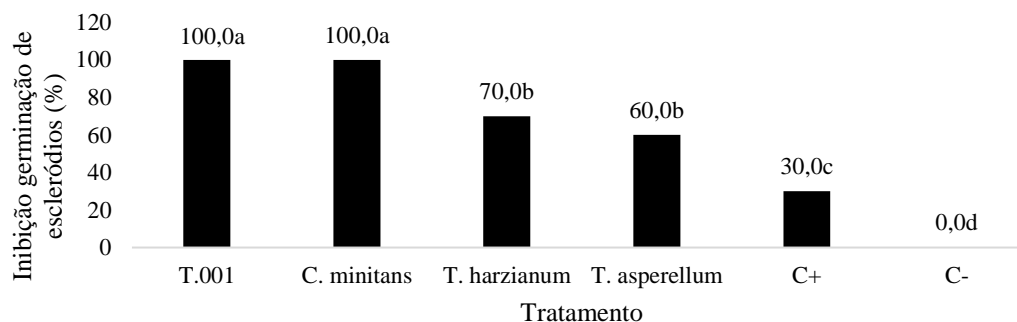


Em (A), C-: controle negativo (*S. sclerotiorum*); em (B), C+: controle positivo (Tiofanto-metílico 350g/L + fluazinan 52,50g/L); em (C), T.001; em (D), *T. harzianum*; em (E), *T. asperellum*; em (F), *C. minitans*.

Os escleródios são estruturas de resistência essenciais para a sobrevivência de *S. sclerotiorum* no solo, podendo, mesmo em condições adversas, permanecer viável no solo por cerca de dez anos (ORDÓÑEZ- VALENCIA *et al.*, 2015). Dessa forma, os danos causados por *S. sclerotiorum* podem ser reduzidos com o uso de fungos antagonistas, sendo estes capazes de colonizar os escleródios, reduzindo a quantidade de propágulos do fitopatógeno (JEGER *et al.*, 2004; KNUDSEN *et al.*, 1991).

Houve diferença significativa na inibição da germinação de escleródios de *S. sclerotiorum* entre os isolados testados. Para os isolados T.001 e *C. minitans*, houve inibição na germinação de *S. sclerotiorum* em 100%. Para o *T. harzianum* e *T. asperellum*, houve 70 e 60% de inibição respectivamente. Em contrapartida, o fungicida comercial apenas retardou o crescimento micelial não impedindo a germinação dos escleródios (Figura 4).

Figura 4: Inibição da germinação de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* submetidos à imersão em soluções de agentes de controle



As barras representam os valores médios \pm Desvio Padrão de cinco repetições. Valores médios acompanhados por letras diferentes são significativamente diferentes pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade. C-: controle negativo (sem presença de agente antagonista). C+: controle positivo (Fungicida comercial – Tiofanto-metílico 350g/L + fluazinan 52,50g/L).

A inibição na germinação de escleródios de *S. sclerotiorum* por *C. minitans* pode ser atribuída à capacidade de decompor células da parede celular de hifas, sobretudo escleródio, por meio de quitinase e glucanase (REN *et al.*, 2007). Além do mais, *C. minitans* estaria envolvido na produção de metabólitos secundários e enzimas quitinases e glucanases que potencializam a colonização e degradação da parede celular.

A degradação da parede celular de fitopatógenos por meio de enzimas como proteases e quitinases é um dos mecanismos responsáveis pela inibição na germinação de escleródios conforme expressos nos resultados. A capacidade em micoparasitar e inibir a germinação de escleródios de *S. sclerotiorum* foi relatada por Gørgen *et al.* (2009), Haddad *et al.* (2017) e Smith *et al.* (2013).

A baixa inibição do Tiofanato metílico e Fluazinam na germinação de escleródios se explica em função do mecanismo de ação pertencente ao Grupo B1 e C5, o qual interfere na formação de microtúbulos mitóticos e na síntese de ATP, no crescimento, porém não impede a germinação dos escleródios (PMRA, 2019). Conforme verificado por Vrisman *et al.* (2014), fluazinam e tiofanato metílico apresentam germinação dos escleródios similar ao controle negativo, reafirmando os resultados obtidos.

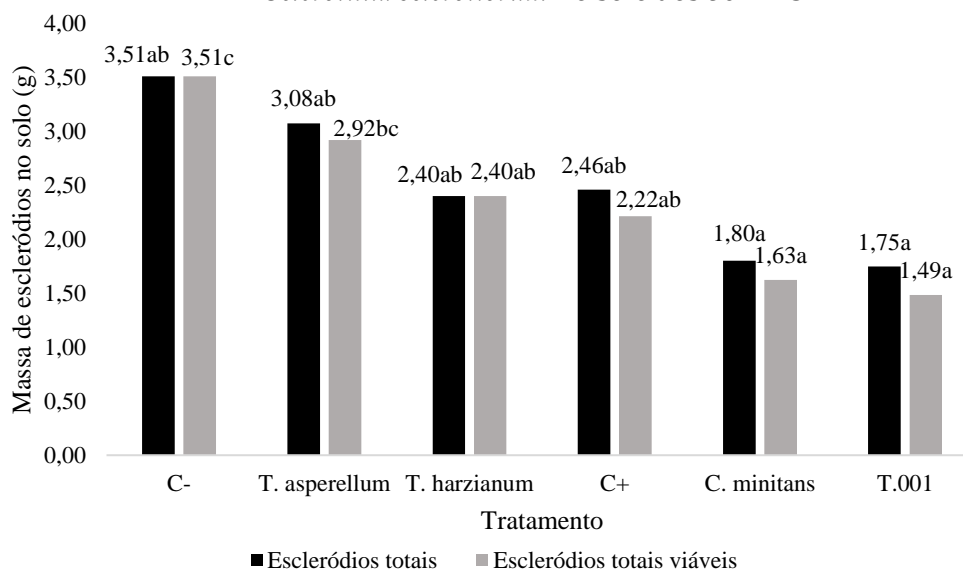
3.3 REDUÇÃO DA TAXA DE INÓCULO DE ESCLERÓDIOS

A distribuição dos escleródios no solo é um dos fatores atribuídos à eficiência no controle, uma vez que os agentes de controle se tornam mais efetivos em situações de agregados de escleródios quando comparados à distribuição aleatória na área (BAE; KNUDSEN, 2007). Nesse contexto, o uso de biocontroladores se torna mais eficaz na redução e/ou na inativação dessas estruturas de resistência, diminuindo-se assim a quantidade de escleródios totais viáveis na área (JEGER *et al.*, 2004; KNUDSEN *et al.*, 1991).

Em relação à quantidade de escleródios totais e escleródios viáveis na área, houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 5). Para os isolados T.001 e C.

minitans, houve maiores reduções significativas na área aos 50 DAS tanto para escleródios totais quanto para escleródios totais viáveis, mostrando efetividade em controlar e/ou inativar estruturas de resistência de *S. sclerotiorum*. Para o *T. harzianum* e *T. asperellum*, não se apresentou significância entre ambos para a variável escleródios totais, em contrapartida se apresentou diferença estatística quando comparados com o controle negativo, porém *T. harzianum* obteve médias inferiores para escleródios totais viáveis em comparação com *T. asperellum*; em ambos houve redução significativa para as duas variáveis em relação ao controle negativo. Para o controle positivo (Tiofanato metílico + fluazinam), apresentou-se semelhança ao *T. harzianum* nas duas variáveis analisadas; em relação ao *T. asperellum*, foram obtidas médias inferiores à quantidade de escleródios totais viáveis na área.

Figura 5: Inibição da massa de escleródios totais e escleródios totais viáveis de *Sclerotinia sclerotiorum* no solo aos 50 DAS



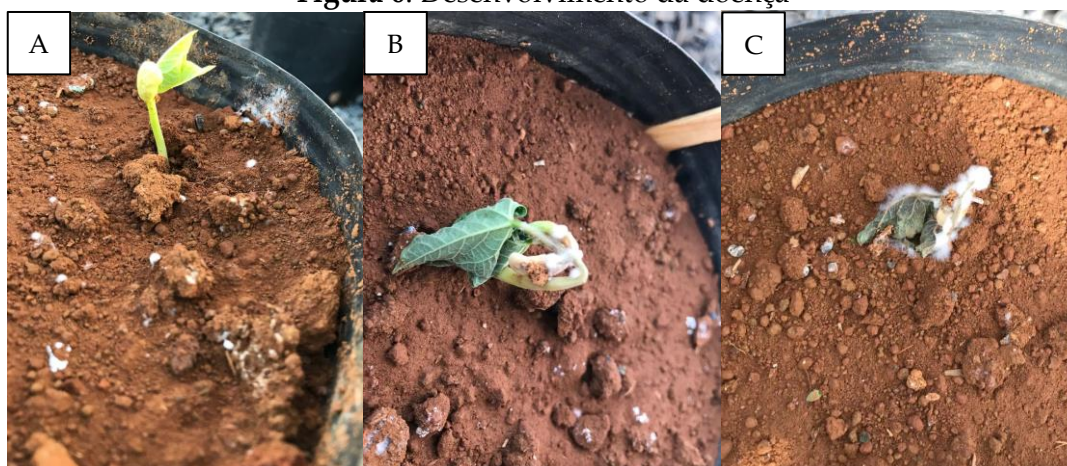
As barras representam valores médios \pm Desvio Padrão de dez repetições. Valores médios acompanhados por letras diferentes são significativamente diferentes pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade. C-: controle negativo (sem presença de agente antagonista). C+: controle positivo (Fungicida comercial – Tiofanato-metílico 350g/L + fluazinam 52,50g/L).

De acordo com Zeng *et al.* (2012), houve redução no número de escleródios no solo em 95,3% quando em presença do antagonista *C. minitans*, reforçando os resultados encontrados – aproximadamente 53,57% de redução na quantidade de escleródios viáveis formados na área. Segundo Haddad *et al.* (2017), a capacidade de *Trichoderma* colonizar escleródios de *S. sclerotiorum*, nesse contexto, explica a redução em 57,55%, 31,63% e 16,80% para os isolados T.001, *T. harzianum* e *T. asperellum* respectivamente, na quantidade de escleródios totais viáveis na área em relação ao controle negativo quando em presença do *Trichoderma*. No controle positivo, houve redução de 36,75% na quantidade de escleródios totais viáveis na área aos 50 DAS, podendo essa redução ser atribuída ao atraso de crescimento micelial de *S. sclerotiorum* em presença de tiofanato metílico + fluazinam como proposto por (PMRA, 2019).

3.4 INCIDÊNCIA DE MOFO BRANCO EM PLANTAS DE FEIJÃO

Como demonstrado na (Figura 6), os sintomas causados por mofo branco são caracterizados por necrose em hastes ou caule e com o desenvolvimento da doença, murchamento seguido por podridão dos tecidos vegetais, seca de folhas e posterior morte da planta. O crescimento do micélio branco nos tecidos lesionados e posterior presença de escleródios são aspectos essenciais para identificar a doença em nível de campo (SMOLIŃSKA; KOWALSKA, 2018).

Figura 6: Desenvolvimento da doença

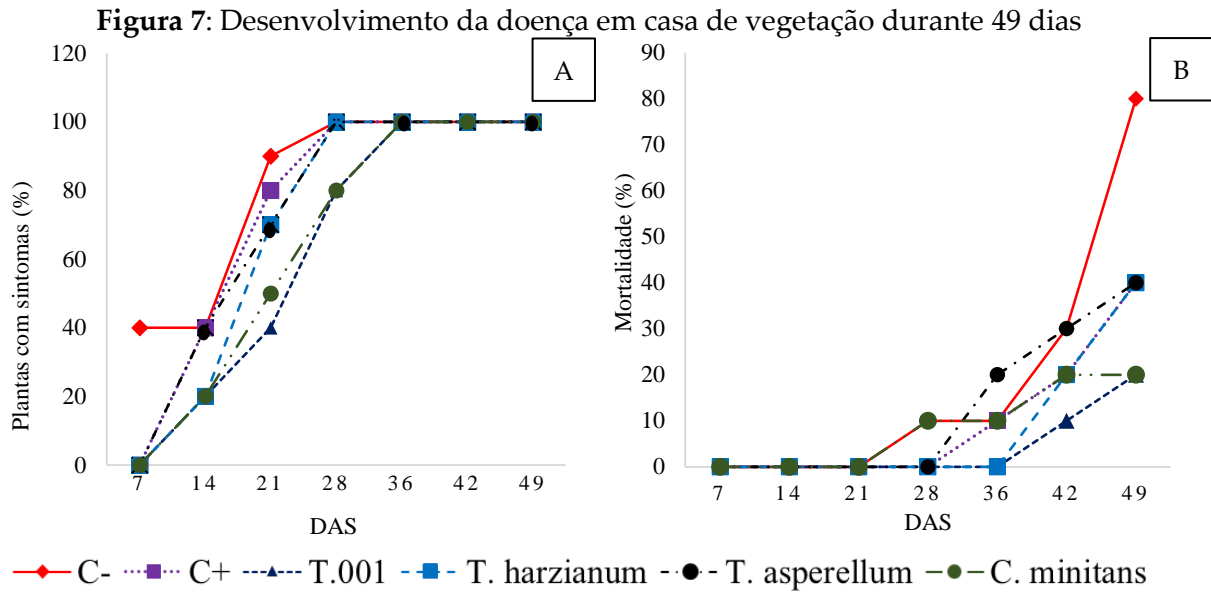


Em (A), planta sem sintomas; em (B), caule com necrose e crescimento micelial; em ©, planta seca e morta com crescimento micelial de *S. sclerotiorum*.

De acordo com Druzhinina *et al.* (2011), o controle de *S. sclerotiorum* por agentes de biocontrole pode ser atribuído ao potencial micoparásita, por meio de ação de enzimas hidrolíticas, metabólitos secundários, os quais exercem atividade antibiótica. Para avaliar o potencial antagonista, os sintomas e mortalidade das plantas foram acompanhados no decorrer do experimento, o desenvolvimento da doença por tratamento (Figura 7).

O número de plantas com sintomas apresentou-se com maior incidência no controle negativo em que aos 7 DAS 40% das plantas apresentavam sintomas. Por outro lado, observou-se um atraso no aparecimento da doença em T.001 e *C. minitans*; aos 14 DAS comprometia 20% das plantas. O pico máximo de aparecimento dos sintomas foi dos 21 aos 36 DAS; após esse período, todas as plantas apresentavam sintomas (Figura 7A). Da mesma forma, a mortalidade foi intensificada aos 36 DAS, tendo maior índices de mortalidade após esse período (Figura 7B).

CONTROLE BIOLÓGICO DE *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* E
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM FEIJOEIRO



Em (A), quantidade de plantas com sintomas (%); em (B), mortalidade (%).

Aos 50 DAS, contabilizou-se o total de mortalidade de plantas e atribuiu-se uma nota na escala de doença (Tabela 1). Os isolados que apresentaram potencial no controle de *S. sclerotiorum* foram T.001 e *C. minitans*, tendo redução de 80% na mortalidade das plantas. Para o fungicida tiofanato metílico + fluazinam, *T. harzianum*, *T. asperellum*, observou-se redução de 60% na mortalidade. Para o controle negativo, observou-se uma mortalidade de 80% e notas 2 e 3 apresentando um estágio avançado da doença mesmo nos 20% que não tiveram mortalidade em 50 dias. Para os demais tratamentos, as notas variaram de 1 a 3, o que mostra que, mesmo ao final de 50 dias, havia plantas com menos de 50% das folhas com sintomas, tendo uma redução na severidade da doença.

Tabela 1: Número de plantas de feijão mortas por mofo branco e escala de notas da doença para manejo em casa de vegetação aos 50 DAS

Tratamentos	Mortalidade (%)	Escala de notas-doenças
<i>S. sclerotiorum</i>	80	2 e 3
Fungicida	40	1,2 e 3
<i>T. asperellum</i>	40	1,2 e 3
<i>T. harzianum</i>	40	1,2 e 3
T.001	20	1,2 e 3
<i>C. minitans</i>	20	1,2 e 3

Valores referencias atribuídos à escala de notas-doenças: 0: plantas sem sintomas; 1: menos de 50% das folhas amareladas (cloróticas) ou murchas; 2: mais de 50% das folhas amareladas (cloróticas) ou murchas; 3: plantas tombadas ou mortas.

3.5 PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO

O emprego de biocontroladores no feijão foi eficaz para os parâmetros de crescimento analisados. Houve diferença estatística significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$), (Tabela 2). O isolado T.001 possibilitou o incremento de biomassa em relação

ao controle negativo de 1104,32% para área foliar e de 787,4% para desenvolvimento radicular. Em relação aos demais isolados, *C. minitans*, *T. harzianum* e *T. asperellum* apresentaram incremento de biomassa em relação ao controle negativo de 856,55%, 1016,84% e 797,99%, para área foliar, e em 481,2%, 650,0% e 569,80%, para desenvolvimento radicular, respectivamente. No entanto, para o controle positivo, houve incremento de 223,94% para área foliar e 232,0% para desenvolvimento radicular. Os resultados se assemelham com os encontrados por Haddad *et al.* (2017); Sumida *et al.* (2018) e Zhang *et al.* (2016).

Tabela 2: Efeito dos tratamentos sobre massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), massa seca de folha (MSF) e área foliar (AF) em feijoeiro aos 50 dias após a semeadura

Tratamentos	Variáveis							
	MSPA (g)		MSR (g)		MSF (g)		AF (cm ²)	
T.001	2,19	a ¹	3,937	a	2,11	a	520,898	a
<i>C. minitans</i>	1,764	a b	2,406	a b	1,728	a b	404,028	a b
<i>T. harzianum</i>	1,798	a b	3,25	a b	1,704	a b c	479,637	a b
<i>T. asperellum</i>	1,511	a b	2,849	a b	1,451	a b c	376,408	a b
Fungicida	0,431	b c	1,16	a b	0,369	b c	105,631	a b
<i>S. sclerotiorum</i>	0,186	c	0,5	b	0,166	c	47,169	b
CV: (%)	91,82		88,79		92,59		99,29	

¹ Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A promoção de crescimento é um mecanismo associado ao controle biológico, visto que, quando o antagonista exerce proteção à planta impedindo a infecção por um determinado fitopatógeno, a planta consegue ter ganhos em incrementos de crescimento (ZHANG *et al.*, 2016). No entanto, características como agressividade, virulência e hábitos de crescimento devem ser consideradas na escolha de um agente antagonista capaz de intervir em processos vitais dos fitopatógenos e promover o desenvolvimento das plantas (MEYER *et al.*, 2019).

De acordo com Herman (2011), a colonização das raízes das plantas por agentes de biocontrole é uma característica importante para proteção contra doenças de solo, além de auxiliar na promoção de crescimento por aumentar o volume radicular e consequentemente a absorção de nutrientes. Segundo Hermosa *et al.* (2013), o agente de biocontrole *Trichoderma* tem capacidade de induzir a planta a produzir hormônios de defesa, impedindo a infecção por patógenos e contribuindo para o ganho de massa produzida.

Os resultados encontrados corroboram os de Chitrampalam *et al.* (2008), que, em estudos para controle de mofo branco em alface, verificaram a eficiência de *Coniothyrium minitans* como agente de biocontrole do fitopatógeno e incremento em desenvolvimento vegetativo. Broetto (2013) verificou que, em feijoeiro, havia um incremento significativo em altura de plantas, quando inoculadas com diferentes isolados de fungos biocontroladores, confirmando os dados obtidos em ganhos de biomassa.

Zhang *et al.* (2016) constataram que o uso de fungos biocontroladores foi capaz de promover aumento da biomassa de parte aérea e sistema radicular em plantas de feijão; nesse contexto, confirmam os resultados encontrados neste estudo, no qual o incremento em biomassa foi significativo nos tratamentos em presença dos fungos antagonistas. Outros trabalhos verificaram o aumento de biomassa na presença de agentes de biocontrole, como Chagas *et al.* (2017), na cultura de arroz, milho, soja e feijão, e Resende *et al.* (2004), na cultura do milho.

4 CONCLUSÃO

No geral, os isolados demonstraram potencial para promoção de crescimento em feijoeiro, redução da massa de escleródios no solo e controle de *S. sclerotiorum* em condições de laboratório e casa de vegetação. Os resultados obtidos confirmam que os isolados proporcionaram controle do mofo branco e promoção de crescimento nos parâmetros avaliados.

REFERÊNCIAS

- BAE, Y. S.; KNUDSEN, G. R. Effect of sclerotial distribution pattern of *Sclerotinia sclerotiorum* on biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. **Applied Soil Ecology**, [S. l.], v. 35, n. 1, p. 21-24, 2007.
- BARRO, J. P. *et al.* Performance and profitability of fungicides for managing soybean white mold: a 10-year summary of cooperative trials. **Plant Disease**, [S. l.], v. 103, n. 9, p. 2212-2220, 2019.
- BENÍTEZ, T. *et al.* Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 249-260, 2004.
- BOLAND, G. J. Stability analysis for evaluating the influence of environment on chemical and biological control of white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) of bean. **Biol. Control**, [S. l.], v. 9, p. 7-14, 1997.
- BOMFIM, M. P. *et al.* Avaliação antagônica in vitro e in vivo de *Trichoderma spp.* a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa phytopathol.**, [S. l.], v. 36, n. 1, p. 61-67, 2010.
- BROETTO, L. **Antagonismo a *Macrophomina phaseolina* e promoção do crescimento em feijoeiro mediados por *Trichoderma spp.*** 2013. 61 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, campus Marechal Cândido Rondon, 2013.
- BUTT, T. M. Fungal biological control agents. **The Royal Society of Chemistry**, [S. l.], p. 186-191, 2000.

CAMPOS, H. D. *et al.* Mofo branco em soja: cenário atual e manejo. In: MEDEIROS, F. H. V. *et al.* **Novos sistemas de produção**, Lavras: UFLA, 2017. p. 53-64.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 70, n. 8, p. 181-184, 1967.

CHAGAS, L. F. B. *et al.* Trichoderma na promoção do crescimento vegetal. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia (MS), v. 4, n. 3, p. 97-102, set. 2017.

CHITRAMPALAM, P. *et al.* Biocontrol of lettuce drop caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor* in desert agroecosystems. **Plant Dis.**, [S. l.], v. 92, p. 1625-1634, 2008.

COTXARRERA, L. *et al.* Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium wilt* of tomato. **Soil Biology and Biochemistry**, [S. l.], v. 34, n. 4, p. 467-476, 2002.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal interactions. **Transactions of the British Mycological Society**, [S. l.], v. 57, p. 359-363, 1971.

DRUZHININA, I. S. *et al.* *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature reviews. Microbiology**, [S. l.], v. 9, n. 10, p. 749-59, 2011.

FAGUNDES-NACARATH, I. R. F.; DEBONA, D.; RODRIGUES, F. A. Oxalic acid-mediated biochemical and physiological changes in the common bean-*Sclerotinia sclerotiorum* interaction. **Plant Physiology and Biochemistry**, [S. l.], v. 129, p. 109-121, 2018.

FERREIRA, D. F. **Estatística básica**. 2. ed. ampl. rev. Lavras: Editora UFLA, 2010.

INDEX FUNGORUM. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, (1884). 2022. Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=212553>. Acesso em: 01 jun. 2022.

GÖRGEN, C. A. *et al.* Controle do mofo-branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [S. l.], v. 44, n. 12, p. 1583-1590, 2009.

HADDAD, P. E. *et al.* Selection of *Trichoderma* spp. strains for the control of *S. sclerotiorum* in soybean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [S. l.], v. 52, n. 12, p. 1140-1148, 2017.

- HAN, Y.; LI, G.; YANG, L.; JIANG, D. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a pacC homolog in the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. **World J Microbiol Biotechnol.**, [S. l.], v. 27, n. 2, p. 381-91, 2010.
- HARMAN, G. E. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, [S. l.], v. 96, n. 2, p. 190-194, 2006.
- HERMAN, G. E. Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. **New Phytologist**, [S. l.], v. 189, p. 647-549, 2011.
- HERMOSA, R. *et al.* The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. **International Microbiology**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 69-80, 2013.
- JAJOR, E.; KORBAS, M.; HOROSZKIEWICZ-JANKA, J.; DANIELEWICZ, J.; BARANIAK, B. The influence of selected biological products on limitation of the development of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia. **Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering**, [S. l.], v. 63, n. 2, p. 92-96, 2017.
- JEGER, M. J. *et al.* The effect of spatial distributions of mycoparasites on biocontrol efficacy: a modelling approach. **Biocontrol Science and Technology**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 359-373, 2004.
- JONES, D.; JOHNSON, R. P. C. Ultrastructure of frozen, fractured and etched pycnidiospores of *Coniothyrium minitans*. **T Brit Mycol Soc.**, [S. l.], v. 55, p. 83-7, 1970.
- JULIATTI, F. *et al.* *Trichoderma* as a Biocontrol Agent against *Sclerotinia* Stem Rot or White Mold on Soybeans in Brazil: Usage and Technology. **Trichoderma - The Most Widely Used Fungicide**, [S. l.], p. 1-23, 2019.
- KNUDSEN, G. R. *et al.* Method to enhance growth and sporulation of pelletized biocontrol fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 57, n. 10, p. 2864-2867, 1991.
- LUCON, C. M. M. *Trichoderma*: uso do bioagente na produção agrícola brasileira. **Tecnologia Sustentável: Trichoderma**, 2016. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/files/pdf/tecnologia_sustentavel/trichoderma.pdf . Acesso em: 01 jun. 2022.
- MEYER, M. C; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C da. *Trichoderma* USO NA AGRICULTURA. Brasília, DF: Embrapa, 2019. 538 p. or White Mold on Soybeans in Brazil: Usage and Technology. **Trichoderma - The Most Widely Used Fungicide**, [S. l.], p. 1-23, 2019.

ORDÓÑEZ-VALENCIA, C. *et al.* Morphological development of sclerotia by *Sclerotinia sclerotiorum*: a view from light and scanning electron microscopy. **Annals of Microbiology**, [S. l.], v. 65, n. 2, p. 765-770, 2015.

PANNULLO, A. *et al.* Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary on common bean by native lipopeptide-producer *Bacillus* strains. **Microbiological Research**, [S. l.], v. 211, p. 21-30, 2018.

PMRA. Pest Management Regulatory Agency. **Proposed re-evaluation decision.** Thiophanate-Methyl and its associated end-use products. Consultation document. PRVD2019-07, jun. 2019.

REN, L.; LI, G.; HAN, Y. C.; JIANG, D. H.; HUANG, H. C. Degradation of oxalic acid by *Coniothyrium minitans* and its effects on production and activity of beta-1,3-glucanase of this mycoparasite. **Biol Control**, [S. l.], v. 43, n. 1, p. 1-11, 2007.

RESENDE, M. L. *et al.* Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciência e Agrotecnologia**, [S. l.], v. 28, n. 4, p. 793-798, 2004.

SMITH, A. *et al.* Diversity of soil-dwelling *Trichoderma* in Colombia and their potential as biocontrol agents against the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Journal of General Plant Pathology**, [S. l.], v. 79, n. 1, p. 74-85, 2013.

SMOLIŃSKA, U.; KOWALSKA, B. Biological control of the soil-borne fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* - a review. **Journal of Plant Pathology**, [S. l.], v. 100, n. 1, p. 1-12, 2018.

SUMIDA, C. H. *et al.* *Trichoderma asperelloides* antagonism to nine *Sclerotinia sclerotiorum* strains and biological control of white mold disease in soybean plants. **Biocontrol Science and Technology**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 142-156, 2018.

VRISMAN, C. M.; HÜLLER, G. C.; SARTORI, F. F.; HENNEBERG, L.; WUTZKI, C. R.; JULIATTI, F. C.; JACCOUD FILHO, D. S. Influência de herbicidas e fungicidas na germinação carpogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 2, p. 477-483, 2014.

ZENG, W.; KIRK, W.; HAO, J. Field management of *Sclerotinia* stem rot soybean using biological control agents. **Biological Control**, [S. l.], v. 60, p. 141-147, 2012.

ZHANG, F. *et al.* Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, [S. l.], v. 100, p. 64-74, 2016.