

Trichoderma spp. para controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e promoção de crescimento em feijoeiro

Trichoderma spp. for control of *Sclerotinia sclerotiorum*
and growth promotion in bean

LUIS CARLOS FERREIRA RODRIGUES

Discente do curso de Agronomia - UNIPAM
E-mail: luisufr@unipam.edu.br

KARLA VILAÇA MARTINS

Professora orientadora - UNIPAM
E-mail: karlavm@unipam.edu.br

Resumo: O emprego de bioprodutos tem se mostrado uma alternativa para diminuir o uso de agroquímicos e melhorar as estratégias de manejo. Microrganismos como *Coniothyrium minitans* e *Trichoderma* spp são mencionados como agentes eficazes no biocontrole de doenças causadas por *S. sclerotiorum*. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso de *Trichoderma* spp. na promoção de crescimento e controle de mofo branco em plantas de feijão. O ensaio foi realizado na Nooa Ciência e Tecnologia LTDA. (NOOA), situada no município de Patos de Minas (MG). Em casa de vegetação, o experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados (DBC). Os dados foram submetidos à análise de variâncias médias dos tratamentos comparadas ao teste Tukey a 5% de probabilidade. *Trichoderma* spp. se mostrou eficaz em controlar mofo branco e promover crescimento em plantas de feijão.

Palavras-chave: Controle biológico. Mofo branco. *Phaseolus vulgaris*, L.

Abstract: The use of bioproducts has been shown as an alternative to decrease the use of agrochemicals and improve management strategies. Microorganisms such as *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma* spp. are mentioned as efficient agents in the biocontrol of diseases caused by *S. sclerotiorum*. Therefore, the present work aimed to evaluate the use of *Trichoderma* spp. in growth promotion and control of white mold in bean plants. The trial was carried out in Nooa Ciência e Tecnologia LTDA. (NOOA), located in the city of Patos de Minas (MG). In the greenhouse, the experiment was conducted in a randomized block design (CCD). The data were submitted to the variance analysis of mean treatment compared to the Tukey test at 5% probability. *Trichoderma* spp. was effective in controlling white mold and promoting growth in bean plants.

Keywords: Biological control. White mold. *Phaseolus vulgaris*, L.

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*. 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 em vagens, hastes, caules e folhas, causando lesões pequenas e aquosas. De acordo com Barro *et al.* (2019); no 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, em que aparecem manchas de micélio cottonoso, 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, oportunistas e competitivos no ambiente (BUTT, 2000).

Trichoderma spp. possui capacidade de reduzir a sobrevivência e o crescimento do patógeno e a infecção que pode causar nas plantas devido aos mecanismos de biocontrole: como antibiose, quando atua como antibiótico na produção de compostos difusos; competição, quando suprime a capacidade de crescimento do patógeno; micoparasitismo, quando se torna uma resposta da planta em função da infecção do patógeno (BENÍTEZ *et al.*, 2004). O presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso de *Trichoderma* spp. na promoção de crescimento e controle de mofo branco em plantas de feijão.

2 METODOLOGIA

2.1. ORIGEM DOS ISOLADOS DE TRICHODERMA SPP.

O isolado de *Trichoderma* sp. foi fornecido pela NOAA Ciência e Tecnologia Agrícola, localizada em Patos de Minas (MG), o qual faz parte do acervo de pesquisa da empresa. O isolado encontra-se armazenado pelo método de preservação de Castellani. Os demais fungos como *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma harzianum* são ingredientes ativos dos produtos comerciais Quality WG e Ecotrich WP, respectivamente.

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 *Trichoderma* sp. NOOA e mantidas a 25 ± 2 °C em B.O.D 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 foram adicionados em 90 mL em solução salina (0,85%) + Polissobarto 80% a (1%). O plaqueamento foi realizado após as amostras terem ficado em agitação a 90 rpm durante 60 minutos. As placas foram incubadas a 25 ± 2 °C em B.O.D por 72 horas; 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 os produtos comerciais Quality WG e Ecotrich WP. Para o isolado de *Trichoderma* sp. NOOA, foram desenvolvidas duas formulações testes, sendo uma em grânulos dispersíveis em água (WG) e outra suspensão concentrada (SC). A aplicação de ambos os produtos foi realizada no sulco de plantio padronizando a concentração de 3×10^{12} conídios ha⁻¹ de ambos os formulados.

2.2 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.; nos testes *in vivo*, foram usados discos de micélio para colonização do substrato, o arroz, utilizado como fonte de inóculo no solo.

Para obtenção dos discos de micélio, em placas de Petri contendo meio de cultura BDA serão depositadas um disco de micélio com cerca de 8 mm de diâmetro do acervo original e mantidas a 22 ± 2 °C em B.O.D, até completa colonização do patógeno por toda superfície da placa.

Para aquisição dos escleródios, foram produzidos meio de fubá e cenoura, proporção de 20g de fubá para 80g de cenoura, autoclavados a 121 °C por 30 minutos. Após o resfriamento do substrato, foram acrescentados três discos de 8 mm de diâmetro contendo estruturas propagativas do fitopatógeno *S. sclerotiorum*. A incubação foi feita em temperatura de 22 ± 2 °C por aproximadamente 20 dias. A partir dessa fase, a escassez de nutriente e espaço induz a produção dos escleródios. Posteriormente, depois da produção dos escleródios, eles foram lavados em água destilada e depositados em papel filtro absorvente até a completa secagem, processo realizado em câmara de fluxo laminar. Os escleródios foram armazenados em ± 4 °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 foi retirada totalmente e aproximadamente 200 g de arroz foram

transferidos 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 e mantido à temperatura de 22 ± 2 °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.

2.3 ANÁLISES PARA AVALIAR O POTENCIAL ANTAGÔNICO DE *TRICHODERMA* SPP.

2.3.1 Inibição da germinação de escleródios de *S. sclerotiorum* por compostos difusíveis produzidos por *Trichoderma* spp.

Para avaliação do potencial antagônico na germinação dos escleródios, 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, sendo utilizados como controle.

Para os demais tratamentos, os escleródios restantes foram imersos por 1 hora em suspensões de *Trichoderma* spp. na concentração de 3×10^{12} conídios ha⁻¹, padronizando a recomendação de uso dos produtos comerciais. Como controle positivo, foi utilizado o fungicida Certeza N 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 eles foram 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. 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 em valores percentuais.

2.4 APLICAÇÃO DE *TRICHODERMA* SPP. PARA O MANEJO DO MOFO BRANCO E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM CASA DE VEGETAÇÃO

O ensaio foi realizado na empresa Nooa Ciência e Tecnologia LTDA. (NOOA), situada no município de Patos de Minas (MG), nas coordenadas geográficas 18°44'01" latitude sul e 46°40'10" longitude oeste. Vasos plásticos de 3 L de capacidade foram preenchidos com 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.

Para 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 foram aplicados na concentração de 3×10^{12} conídios ha^{-1} no sulco de plantio, com auxílio de pulverizador de compressão. Como controle positivo, foi realizado o tratamento de semente com o fungicida Certeza N, na dose de 430 mL de p.c./ 100 kg de sementes, concentração vide fabricante. O tratamento sem aplicação em que foram depositadas apenas estruturas do fitopatógeno foi considerado controle negativo.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação climatizada à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa 60%, irrigadas diariamente. O desbaste foi realizado após emergência das plântulas, deixando uma planta por vaso. O experimento foi conduzido por 40 dias, período no qual foi realizada avaliação da incidência de doença, variáveis fotossintéticas e variáveis de crescimento. O delineamento experimental adotado foram blocos casualizados DBC com 10 repetições, considerando-se cada vaso uma unidade experimental.

2.4.1 Teor de clorofila na folha

Aos 20 e 40 dias após a semeadura, foi determinado o índice SPAD, através do medidor portátil de clorofila (clorofilômetro marca Minolta, modelo SPAD-502), que permite leituras instantâneas do teor relativo de clorofila na folha sem destruí-la.

2.4.2 Fitomassa seca

A raiz e o caule, para determinação da fitomassa seca, foram acondicionados separadamente em sacos de papel e submetidos 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.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

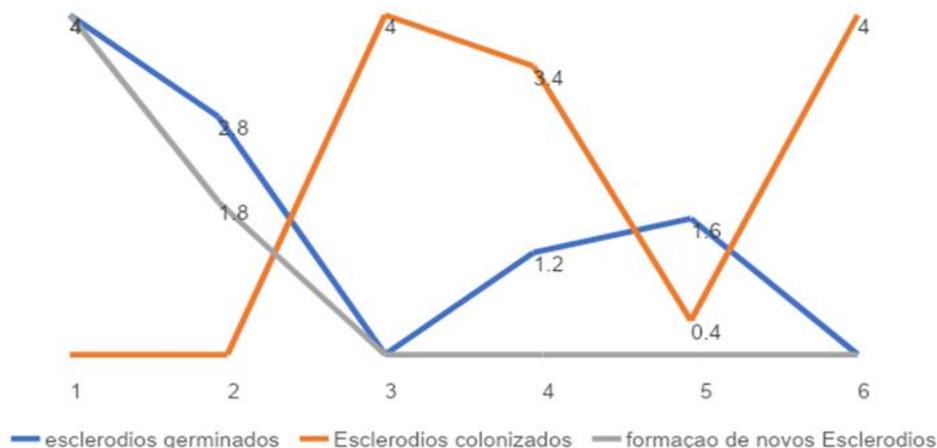
Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de significância. As análises foram realizadas utilizando pacote estatístico do programa SAS, versão 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inibição da germinação dos escleródios variou significativamente entre os tratamentos (Figura 1). Os isolados *Trichoderma* spp. e *C. minitans* foram os mais eficientes na inibição da germinação dos escleródios, alcançando 100,0 % de inibição a 20°C . Mostraram significância para a redução de formação de novos escleródios, em contrapartida, para os tratamentos à base do produto químico Certeza N e para o *Trichoderma asperellum*, não houve resultados significativos para redução na

porcentagem de germinação de escleródios e conseqüentemente houve a indução de formação de novos propágulos na área.

Figura 1: Inibição da germinação de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* submetidos a diferentes agentes de biocontrole



Fonte: dados da pesquisa, 2021.

Aos 20 DAP, houve diferença significativa para as variáveis: SPAD, altura, peso seco de raiz (PSR) e peso seco de parte aérea (PSPA), se comparados os demais tratamentos com o controle; já os tratamentos que receberam aplicação de agentes de biocontrole e o Certeza N, não houve diferença significativa. De uma forma geral, todos os tratamentos com presença de algum agente de controle sobre o mofo branco foram superiores ao controle, para as variáveis citadas. Dentre os demais tratamentos, não houve diferença estatística em relação ao controle, de acordo com a Tabela 1. As análises do 40 DAP não foram realizadas em função de contaminação entre os tratamentos, fazendo-se necessária uma nova experimentação.

Tabela 1: Efeito dos tratamentos sobre o SPAD, altura, peso seco de raiz (PSR) e peso seco de parte aérea (PSPA) da soja aos 20 dias após o plantio

Tratamento	30 DAP			
	SPAD	Altura (cm)	PSR (g)	PSPA (g)
1	30,6 ab ¹	20,1 b	0,61 c	1,06 b
2	29,0 b	23,0 a	0,86 ab	1,87 a
3	32,7 a	24,2 a	0,97 a	2,04 a
4	32,0 ab	23,0 a	0,85 ab	2,02 a
5	31,3 ab	23,1 a	0,84 ab	2,12 a
6	31,4 ab	22,6 a	0,75 bc	1,86 a
CV (%)	9,8	7,2	18,7	14,7

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

Fonte: dados da pesquisa, 2021.

4 CONCLUSÃO

No geral, os isolados demonstraram potencial para promoção de crescimento em feijoeiro e controle de *S. sclerotiorum* em condições de laboratório e casa de vegetação.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. M. R. *et al.* Doenças da soja. In: KIMARI, H. *et al.* (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. p. 597-618.
- ALMEIDA, L. D. *et al.* Característica do feijão carioca no cultivar: um novo cultivar. **Bragantia**, v. 30, p. 33-38, 1971.
- BARRO, J. *et al.* Performance and profitability of fungicides for managing soybean white mold: a 10-year summary of cooperative trials. **Plant Disease**, v. 103, n. 9, p. 2212-2220, 2019.
- BELL, A. A.; WHEELER, M. H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. **Annual Review of Phytopathology**, v. 24, p. 411-451, 1986.
- BENÍTEZ, T. *et al.* Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 249-260, 2004.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2006.
- BOMFIM, M. P. *et al.* Avaliação antagônica *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathol.**, v. 36, n. 1, p. 61-67, 2010.
- BROTMAN, Y. *et al.* *Trichoderma*-Plant Root Colonization: Escaping Early Plant Defense Responses and Activation of the Antioxidant Machinery for Saline Stress Tolerance. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 3, 2013.
- BUTT, T. M. Fungal biological control agents. **The Royal Society of Chemistry**, p. 186-191, 2000.
- CAMPOS, H. D. *et al.* Mofo branco em soja: cenário atual e manejo. In: MEDEIROS, F. H. V. *et al.* (Ed.). **Novos sistemas de produção**. Lavras: UFLA, 2017. p. 53-64.
- CHOI, I. Y. *et al.* Confirmation of *Sclerotinia sclerotiorum* as the causal agent of stem rot of stock in Korea. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 12, n. 1, p. 22, 2017.

DERBYSHIRE, M. *et al.* The complete genome sequence of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* reveals insights into the genome architecture of broad host range pathogens. **Genome Biology and Evolution**, v. 9, n. 3, p. 593-618, 2017.

DEVI, P. *et al.* Characterization of Indian native isolates of *Trichoderma* spp. and assessment of their bio-control efficiency against plant pathogens. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 85, p. 15150-15160, 2012.

FAGUNDES-NACARATH, I. R. F. *et al.* Oxalic acid-mediated biochemical and physiological changes in the common bean-*Sclerotinia sclerotiorum* interaction. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 129, p. 109-121, 2018.

FORTES, F. de O. *et al.* Root induction from microcutting of an *Eucalyptus* sp. clone by *Trichoderma* spp. **Revista Árvore**, v. 31, n. 2, p. 221-228, 2007.

HARMAN, Gary E. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, [S. l.], v. 96, n. 2, p. 190-194, fev. 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-96-0190>.

HYMOWITZ, T. On the domestication of the soybean. **Economic Botany**, New York, v. 24, p. 408-421, 1970.

JAJOR, E. *et al.* The influence of selected biological products on limitation of the development of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia. **Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering**, v. 63, n. 2, p. 92-96, 2017.

LEITE, R. M. V. B. C. Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. **Comunicado Técnico**. Londrina: Embrapa, 2005. p. 1-3. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPSO-2009-09/24980/1/comtec76.pdf>.

LOPES, C. A.; REIS, A. Doenças do tomateiro cultivado em ambiente protegido. **Circular Técnica**. Brasília: Embrapa, 2011. p. 1-26. Disponível em: <file:///D:/Meus%20Documentos%20-%20Fepam/Downloads/ct-100.pdf>.

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

PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution and impact. **Phytopathology**, v. 69, n. 8, p. 875-880, 1979.

SHANMUGAIAH, V. *et al.* Effect of single application of *Trichoderma viride* and *Pseudomonas fluorescens* on growth promotion in cotton plants. **African Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 11, p. 1220-1225, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 4. ed. Sunderland: Sinauer Associates Inc. Publishers, 2006.

VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. (Eds). **Feijão**. 2. ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, p. 41-65, 2006.

ZHANG, F. *et al.* Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 100, p. 64-74, 2015.