

BIOCONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* POR ESPÉCIES DE *Trichoderma* PROVENIENTES DE SISTEMAS AGROFLORESTAIS

ANA CLÁUDIA TENÓRIO DO AMARAL¹
ANTONIO FÉLIX DA COSTA²
PATRÍCIA VIEIRA TIAGO¹
NEIVA TINTI DE OLIVEIRA¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Recife, Pernambuco.

² Instituto Agrônômico de Pernambuco, Recife, Pernambuco

E-mail para correspondência: ana-claudia52@hotmail.com

Resumo: O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de controle de espécies de *Trichoderma* sobre *Sclerotinia sclerotiorum* causador do mofo-branco do feijoeiro. Foram utilizados 15 isolados de *Trichoderma* obtidos de solos de sistemas agroflorestais e dois de *S. sclerotiorum* obtidos de plantas de *Phaseolus vulgaris* com sintomas da doença. O potencial de controle foi avaliado *in vitro* pelo método de cultura pareada. Os isolados de *S. sclerotiorum* e *Trichoderma* foram inoculados opostamente em placas de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA), respeitando a velocidade de crescimento de cada um, e incubados em estufa para BOD a 25 °C. O percentual de inibição do patógeno foi determinado por medições do crescimento radial do mesmo aos 12 dias após inoculação dos isolados de *Trichoderma*. A maioria dos isolados de *Trichoderma* foi capaz de reduzir o crescimento micelial dos isolados de *S. sclerotiorum*, com valores que variaram entre 56,94% e 70,83%, destacando-se os isolados T10 de *T. atroviride* e T13 de *T. asperelloides*. Os resultados indicam que estes últimos podem ser indicados para ensaios *in vivo* de controle de *S. sclerotiorum*, com a finalidade de inclusão em programas de manejo integrado do mofo-branco em feijão.

Termos para indexação: Biocontrole, mofo-branco, *Phaseolus vulgaris*.

BIOCONTROL OF *Sclerotinia sclerotiorum* BY *Trichoderma* SPECIES FROM AGROFORESTRY SYSTEMS

Abstrac: The objective of the study was to evaluate the potential to control of *Trichoderma* species on *Sclerotinia sclerotiorum* causing of the white mold in bean. Fifteen of *Trichoderma* isolates obtained from soils of agroforestry systems and two *S. sclerotiorum* obtained from plants of *Phaseolus vulgaris* with symptoms of the disease were used. The control potential was evaluated *in vitro* by the paired culture method. The *S. sclerotiorum* and *Trichoderma* isolates were inoculated oppositely in Petri dishes containing Potato Dextrose Agar (PDA) culture medium, respecting the growth rate of each, and incubated in a greenhouse for BOD at 25 ° C. The percentage of inhibition of the pathogen was determined by measurements of the radial growth of same at 12 days after inoculation of *Trichoderma* isolates. Most of the *Trichoderma* isolates were able to reduce the mycelial growth of *S. sclerotiorum* isolates, ranging from

56.94% to 70.83%, standing out isolates T10 from *T. atroviride* and T13 from *T. asperelloides*. The results indicate that the latter can be indicated for *in vivo* control trials of *S. sclerotiorum*, for the purpose of inclusion in programs of integrated management of white mold on beans. Index terms: Biocontrol, white mold, *Phaseolus vulgaris*.

INTRODUÇÃO

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) pode sofrer com a ação de diversos fitopatógenos presentes no solo, dentre eles *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary, causador da doença chamada de mofo branco, que é uma das principais motivadoras de perdas nesta cultura no Brasil (PAULA JÚNIOR; ZAMBOLIM, 2006; JACCOUD FILHO et al., 2017).

Sclerotinia sclerotiorum apresenta ampla distribuição geográfica podendo atingir diversas espécies de plantas hospedeiras. O fungo produz esclerócios que são estruturas resistentes que sobrevivem no solo por períodos de 4 a 5 anos (ADAMS; AYERS, 1979) o que mantém seu potencial infectivo por sucessivas estações de crescimento da planta. A estrutura das populações de *S. sclerotiorum* evidencia reprodução clonal e também sexual (ARBAOUI et al., 2008) que favorece a variabilidade genética. O fluxo de genes dentro das populações do patógeno parece ser muito alto, promovendo oportunidades de propagação de alelos raros incluindo aqueles que conferem resistência a fungicidas e virulência (GOMES et al., 2011). Por estes motivos é complexo o controle das doenças causadas por este patógeno e normalmente é recomendado o manejo integrado (TU, 1997; GOMES et al., 2011) incluindo rotação de culturas e utilização de produtos químicos ou biológicos (BOLTON et al., 2006; PANKAJ et al., 2010; JACCOUD FILHO et al., 2017).

Os sistemas agroflorestais (SAFs) podem comportar culturas de importância consorciadas com espécies florestais (MAY; TROVATTO, 2008). Os solos desses sistemas podem apresentar uma grande riqueza de espécies fúngicas, e dentre as espécies muitas pertencentes ao gênero *Trichoderma* (COSTA et al., 2012; COSTA et al., 2017).

Espécies de *Trichoderma* têm sido amplamente utilizadas em controle biológico de fungos causadores de doenças de plantas, agindo por competição pelo substrato, pela indução de resistência nas plantas, pelo micoparasitismo, pelo fato de ocorrer em variados sistemas de cultivos e por apresentar alta variabilidade genética e morfológica (HARMAN et al., 2004; CARVALHO et al., 2018).

Vários estudos relatam a ação de espécies de *Trichoderma* contra fitopatógenos em culturas de importância econômica como *Glycine max* (L.) Merr. (KHALEDI; TAHERI, 2016; HADDAD et al. 2017), *Theobroma cacao* L. (HANADA et al., 2008), *Mangifera indica* L. (SANTOS-VILLALOBOS et al., 2013), além de *P. vulgaris* (FIGUEIRÊDO et al., 2010). A investigação e prospecção de solo de ambientes como os SAFs podem revelar isolados de espécies de *Trichoderma* com alto potencial para o controle biológico.

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* o potencial de controle de espécies de *Trichoderma* provenientes de sistemas agroflorestais sobre *S. sclerotiorum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 15 isolados de *Trichoderma* obtidos de solos de sistemas agroflorestais de localidades do Estado de Pernambuco (COSTA et al., 2017) e dois

isolados de *S. sclerotiorum* (Ss2 e Ss3) obtidos de plantas de *P. vulgaris* com sintomas de mofo branco, fornecidos pelo

Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA)
(Recife, PE) (Tabela 1).

Tabela 1- Espécies e isolados de *Trichoderma* obtidos de solo de sistemas agroflorestais de localidades do Estado de Pernambuco.

Espécie	Isolado
<i>T. longibrachiatum</i> Rifai	T1
<i>T. asperellum</i> Samuels, Lieckf. & Nirenberg	T2 e T15
<i>T. afroharzianum</i> P. Chaverri, F.B. Rocha & I. Druzhinina	T3 e T7
<i>T. atroviride</i> P. Karst.	T4, T5, T6, T8, T9 e T10
<i>T. brevicompactum</i> Chaverri, Rocha, Degenkolb & Druzhinina	T11 e T14
<i>T. breve</i> K. Chen & W.Y. Zhuang	T12
<i>T. asperelloides</i> Samuels	T13

As espécies de *Trichoderma* foram identificadas molecularmente por meio da amplificação e sequenciamento da região gênica TEF-1 α do DNA (CARBONE; KOHN, 1999; SAMUELS et al., 2002). Os produtos de PCR amplificados foram purificados e as sequências obtidas comparadas com as mais similares depositadas no GenBank.

Para determinação da velocidade de crescimento, foram depositados discos de micélio-ágar (5 mm) dos isolados de *Trichoderma* e *S. sclerotiorum*, separadamente, no centro de placas de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA). Os fungos foram incubados em estufa para BOD a 25 °C e realizadas medições diárias do crescimento micelial durante cinco dias (LILLY; BARNETT, 1951, adaptada).

A inibição do crescimento *in vitro* dos isolados de *S. sclerotiorum* pelos

isolados de *Trichoderma* foi determinada por meio da técnica de cultivo pareado (DENNIS; WEBSTER, 1971). Patógeno e antagonista foram cultivados, separadamente, em meio BDA por sete dias a 25 °C. Após esse período, foram retirados das bordas das colônias discos de micélio-ágar (5 mm de diâmetro) e depositados em posições opostas, a 10 mm da borda das placas de Petri contendo meio BDA, respeitando-se as velocidades de crescimento dos fungos obtidas anteriormente. As placas foram mantidas em estufa para BOD a 25 °C durante 12 dias e após esse período foi realizada a avaliação do percentual de inibição por meio de medições do crescimento radial das colônias do patógeno (NUANGMEK et al., 2008). As interações entre os fungos foram determinadas por meio de observações em microscopia óptica do ponto de contato entre antagonista e patógeno.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maioria dos isolados de *Trichoderma* apresentou potencial antagônico *in vitro* contra *S. sclerotiorum* causando inibição significativa no crescimento micelial dos isolados Ss2 e Ss3 de *S. sclerotiorum*. Para o isolado Ss2 de *S. sclerotiorum*, o maior valor de inibição registrado foi de 56,94%, provocado pelo isolado T10 de *T. atroviride*. Para o isolado Ss3 de *S. sclerotiorum* os maiores valores de inibição micelial foram de 70,83% e 68,88%, ocasionadas pelos isolados T13 de *T. asperelloides* e *T. breve* (T12), respectivamente (Tabela 2).

Espécies de *Trichoderma* estão entre as mais recomendadas para o

biocontrole de patógenos (BETTIOL et al., 2012). Muitos trabalhos têm demonstrado o potencial antagônico *in vitro*, de isolados de *Trichoderma* contra fitopatógenos, dentre eles: *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* J.B. Kendr. & W.C. Snyder (CARVALHO et al., 2011), *Ceratocystis cacaofunesta* Engelbrecht & T.C. Harr. (RODRIGUES et al., 2018), *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (Burkh.) W.C. Snyder & H.N. Hansene (LOUZADA et al., 2009), *Sclerotium rolfsii* Sacc. (PARMAR et al., 2015) e *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (VALENZUELA et al., 2015).

Tabela 2- Porcentagem de inibição do crescimento micelial dos isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss) por isolados de *Trichoderma* (T) *in vitro* em cultivo pareado em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) a 25°C por 12 dias.

Isolados de <i>Trichoderma</i> (T)	Porcentagem de inibição do crescimento micelial dos isolados de <i>S. sclerotiorum</i>	
	Ss2	Ss3
<i>T. longibrachiatum</i> T1	55,83 ab	55,55bcd
<i>T. asperellum</i> T2	49,72 abc	56,94bcd
<i>T. afroharzianum</i> T3	50,28 abc	63,89ab
<i>T. atroviride</i> T4	50,84 ab	62,50ab
<i>T. atroviride</i> T5	48,89 abc	51,94cd
<i>T. atroviride</i> T6	48,89 abc	57,22bcd
<i>T. afroharzianum</i> T7	50,56 abc	64,72ab
<i>T. atroviride</i> T8	49,72 abc	56,94bcd
<i>T. atroviride</i> T9	46,11 abc	49,22cd
<i>T. atroviride</i> T10	56,94 a	58,44bc
<i>T. brevicompactum</i> T11	38,61 c	47,94d
<i>T. breve</i> T12	46,67 abc	68,88a
<i>T. asperelloides</i> T13	44,73 bc	70,83a
<i>T. brevicompactum</i> T14	52,50 ab	51,67cd
<i>T. asperellum</i> T15	47,22 abc	51,14cd
Testemunha	0,00 d	0,00e
Coeficiente de variação	10,36%	7,12%

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Quanto a espécie *S. sclerotiorum*, Figueirêdo et al. (2010) relataram o potencial de controle *in vitro* de *S. sclerotiorum* por um isolado de *T. harzianum*. As espécies *T. brevicompactum* e *T. koningiopsis* Samuels, C. Suárez & H.C. Evans também apresentaram capacidade de inibição do crescimento, do mesmo patógeno, em valores acima de 70% (MARQUES et al., 2016).

Neste estudo foi evidenciada a sobreposição pelos isolados de *Trichoderma* sobre os isolados de *S. sclerotiorum*, demonstrando competição por espaço e nutrientes. Também foi possível observar a ocorrência de halo de inibição, o que pode ser atribuído a possível produção de antibióticos pelos isolados antagonistas. A competição e a antibiose representam importantes formas de biocontrole utilizada por espécies de *Trichoderma* contra diversos patógenos (BENÍTEZ et al., 2004; MENDOZA et al., 2015).

Foram verificadas interações entre hifas dos antagonistas e fitopatógeno nas áreas de contato evidenciando o

micoparasitismo. Este mecanismo é considerado complexo e um importante modo de ação utilizado por algumas espécies de *Trichoderma* (HARMAN, 2000; TROIAN et al., 2014). Outros autores também relataram a ocorrência de micoparasitismo de isolados de *Trichoderma* sobre *S. sclerotiorum* (FIGUEIREDO et al., 2010; TROIAN et al., 2014; ZHANG et al., 2016).

Produtos a base de *T. harzianum* estão entre os mais utilizados para o manejo de doenças de plantas (BETTIOL et al., 2012), entretanto, não há relatos anteriores sobre a utilização de produtos a base de *T. longibrachiatum*, *T. brevicompactum*, *T. breve* e *T. asperelloides* para o controle de *S. sclerotiorum*.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que os solos de SAFs podem abrigar espécies de *Trichoderma* com grande potencial para manejo de doenças de plantas e demonstram que as espécies *T. atroviride*, *T. asperelloides* e *T. breve* tem potencial para uso no controle de *S. sclerotiorum*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de

Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa ao primeiro autor.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, P. B.; AYERS, W.A. Ecology of *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, 69: 896-899, 1979.
- ARBAOUI, M.; KRAIC, J. ; HUSZAR, J. Genetic variation of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from different conditions. **Agriculture (Poľnohospodárstvo)** 54: 36–39, 2008.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, 7:249-260, 2004.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, Z. V.; PAULA JUNIOR, T. J.; CORREA, E. B., M. A. B.; LUCON, C. M. M.; COSTA, J. C. B., BEZERRA, J. L. **Produtos Comerciais à**

Base de Agentes de Biocontrole de Doenças de Plantas. Embrapa Meio Ambiente, Documento 88, 155, 2012.

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**, 7: 1–16, 2006.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, 91: 553-556, 1999.

CARVALHO, D. D. C.; INGLIS, P. W.; ÁVILA, Z. R.; MARTINS, I.; MUNIZ, P. H. P. C.; MELLO, S. C. M. Morphological Characteristics and Genetic Variability of *Trichoderma* spp. From Conventional Cotton Crop Soils in Federal District, Brazil. **Journal of Agricultural Science**, 10: 146-155, 2018.

CARVALHO, D. D.C.; MELLO, S. C.M.; LOBO JÚNIOR, M.; SILVA, M. C. Controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in vitro e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, 36:028-034, 2011.

COSTA, P. M. O.; SOUZA-MOTTA, C. M.; MALOSSO, E. Diversity of filamentous fungi in different systems of land use. **Agroforest Syst**, 85:195–203, 2012.

COSTA, P. M. O.; ARAÚJO, M. A. G.; SANTOS, P. J. P.; SOUZA-MOTTA, C. M.; MALOSSO, E. Richness and abundance of filamentous fungi in complex agroforestry multistrata system soil. **Revista Brasileira de Agroecologia**, 2(4): 232-241, 2017.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*: III – Hyphal interactions. **Transactions of the British Mycological Society**, 57: 363-369, 1971.

FIGUEIRÊDO, G. S.; FIGUEIRÊDO, L. C.; CAVALCANTI, F. C. N.; SANTOS, A. C.; COSTA, A. F.; OLIVEIRA, N. T. Biological and Chemical Control of *Sclerotinia sclerotiorum* using *Trichoderma* spp. and *Ulocladium atrum* and pathogenicity to bean plants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 53: 1-9, 2010.

GOMES, E. V.; NASCIMENTO, L. B.; FREITAS, M. A.; NASSER, L. C. B.; PETROFEZA, S. Microsatellite Markers Reveal Genetic Variation within *Sclerotinia sclerotiorum* Populations in Irrigated Dry Bean Crops in Brazil. **J Phytopathol**, 159: 94–99, 2011.

HADDAD, P. E.; LEITE, L. G.; LUCON, C. M. M.; HAKAKAVA, R. Selection of *Trichoderma* spp. strains for the control of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 52: 1140-1148, 2017.

HANADA, R. E.; SOUZA, T. J.; POMELLA, A. W.V.; HEBBAR, K. P.; PEREIRA, J. O.; ISMAIEL, A.; SAMUELS, G. J. *Trichoderma martiale* sp. nov., a new endophyte from sapwood of *Theobroma cacao* with a potential for biological control. **Mycological Research**, 112: 1335–1343, 2008.

- HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. **Plant Disease**, 84:377–393, 2000.
- KHALEDI, N.; TAHERI, P. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against soybean charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina*. **Journal of Plant Protection Research**, 56: 91-102, 2016.
- JACCOUD FILHO, D. S. J.; HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E. M. G. C. **Mofó-branco: *Sclerotinia sclerotiorum***. Ponta Grossa, PR: Todapalavra, 2017.
- LILLY, G.V.; BARNETT, H. L. **Physiology of the fungi**. New York: McGraw-Hill Book, 1951.
- LOUZADA, G.A.S.; CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M.; LOBO JÚNIOR, M.; MARTINS, I.; BRAÚNA, L. M. Antagonist potential of *Trichoderma* spp. from distinct agricultural ecosystems against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium solani*. **Biota Neotropica**, 9(3): 145-149, 2009.
- MARQUES, E.; MARTINS, I.; CUNHA, M. O. C.; LIMA, M. A.; SILVA, J. B. T.; SILVA, J. P.; INGLIS, P. W.; MELLO, S. C. M. New isolates of *Trichoderma* antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biota Neotropica** 16(3): e20160218, 2016
- MAY, P. H.; TROVATTO, C. M. M. **Manual agroflorestal para a Mata Atlântica**. Brasília, DF: Ministério do Desenvolvimento Agrário, 2008.
- MENDOZA, J. L. H.; PÉREZ, M. I. S.; PRIETO, J. M. G.; VELÁSQUEZ, J. D. Q.; OLIVARES, J. G. G.; LANGARICA, H. R. G. Antibiosis of *Trichoderma* spp strains native to northeastern Mexico against the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. **Braz. J. Microbiol**, 46: 1093-1101, 2015.
- NUANGMEK, W.; MCKENZIE, E. H. C.; LUMYONG, S. Endophytic Fungi from wild banana (*Musa acuminata* Colla) Works against anthracnose disease caused by *Colletotricum muse*. **Research Journal of Microbiology**, 3: 368-374, 2008.
- PARMAR, H. J.; HASSAN, M. M.; BODAR, N.P.; UMRANIA, V.V.; PATEL, S.V.; LAKHANI, H. N. *In vitro* antagonism between phytopathogenic fungi *Sclerotium rolfsii* and *Trichoderma* strains. **International Journal of Applied Sciences and Biotechnology**, 3: 16-19, 2015.
- PAULA JÚNIOR, T. J.; ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. (Eds.). **Feijão**. Viçosa: UFV, 2006. p. 359-414.
- PANKAJ, P.; RAVINDER, K.; PRASHANT, M. Integrated approach for the management of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, causing stem rot of chickpea. **Indian Phytopathology**, 64 (1) : 37-40, 2011.

RODRIGUES, G. S.; MAGALHÃES, D. M. A.; COSTA, A. M.; LUZ, E. D. M. N. Antagonism of *Trichoderma* spp. To the etiological agent of Ceratocystis wilt in cacao. **Summa Phytopathologica**, 44: 72-78, 2018.

SAMUELS, G. J.; DODD, S. L., GAMS, W.; CASTLEBURY, L. A.; PETRINI, O. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. **Mycologia**, 94:146-170, 2002.

SANTOS-VILLALOBOS, S.; GUZMÁN-ORTIZ, D. A.; GÓMEZ-LIM, M. A.; DÉLANO-FRIER, J. P.; DE-FOLTER, S.; SÁNCHEZ-GARCÍA, P.; PEÑA-CABRIALES, J. J. Potential use of *Trichoderma asperellum* (Samuels, Liechfeldt & Nirenberg) T8a as a biological control agent against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.). **Biological Control**, 64: 37–44, 2013.

TROIAN, R. F.; STEINDORFF, A. S.; RAMADA, M. H. S.; ARRUDA, W.; ULHOA, C. J. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* against *Sclerotinia sclerotiorum*: evaluation of antagonism and expression of cell wall-degrading enzymes genes. **Biotechnol Lett**, 36:2095–2101, 2014.

TU, J. C. An integrated control of white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) of beans, with emphasis on recent advances in biological control. **Bot Bull Acad Sin**, 38:73–76, 1997.

VALENZUELA, N. L.; ANGEL, D.N.; ORTIZ, D.T.; ROSAS, R. A.; GARCÍA, C. F. O. SANTOS, M.O. Biological control of anthracnose by postharvest application of *Trichoderma* spp. on maradol papaya fruit. **Biological Control**, 91: 88–93, 2015.

ZHANG, F.; GE, H.; ZHANG, F.; GUO, N.; WANG, Y., CHEN, L.; JI, X.; LI, C. Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, 100: 64-74, 2016.