

# Avaliação à campo de *Trichoderma* em mofo-branco

Maurício Conrado Meyer

Hercules Diniz Campos

Murillo Lobo Junior

## Introdução

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary é o agente causal do mofo-branco, uma doença de importância mundial, que afeta a produtividade de inúmeras culturas como a soja [(*Glycine max* (L.) Merr.], feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), canola (*Brassica napus* L.), algodão (*Gossypium hirsutum* L.), amendoim (*Arachis hypogaea* L.), batata (*Solanum tuberosum* L.), girassol (*Helianthus annuus* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), ervilha (*Pisum sativum* L.), entre outras (Boland; Hall 1994; Lobo Junior. et al., 2000; Jaccoud Filho et al., 2017).

O patógeno produz estruturas de sobrevivência denominadas escleródios, que permanecem no solo e constituem a fonte primária de inóculo do mofo-branco. Em condições de elevada umidade do solo, temperaturas em torno de 15 e 20 °C e sombreamento do solo, os escleródios germinam, produzindo estruturas infectivas (micélio ou ascósporos) capazes de desencadear a doença nas plantas hospedeiras (Meyer et al., 2010; Peltier et al., 2012; Jaccoud Filho et al., 2017).

O manejo do mofo-branco requer a adoção conjunta de medidas culturais, uso de fungicidas e de agentes de controle biológico, com o objetivo de prevenir e controlar a doença nas plantas e de reduzir a quantidade de inóculo (Meyer et al., 2016). A redução da população de escleródios (fonte do inóculo inicial) no solo é um elemento-chave para o manejo integrado da doença.

O controle biológico de *S. sclerotiorum* ocorre principalmente pela ação de microrganismos que parasitam e degradam os escleródios no solo, reduzindo a densidade de inóculo do patógeno nas áreas infestadas. Dentre esses microrganismos, os mais amplamente utilizados

no Brasil são algumas espécies do fungo *Trichoderma* e da bactéria *Bacillus*, já havendo mais de 30 produtos registrados e disponíveis no mercado (Meyer et al., 2016; Agrofit, c2003).

A ação de *Trichoderma* spp. é extremamente dependente de condições ambientais favoráveis ao seu estabelecimento no solo, o que pode limitar sua eficiência de controle sobre os fitopatógenos (Lobo Junior. et al., 2018; Ghazanfar et al., 2018). Essa condição é a principal causa de variações nos resultados de experimentos de eficiência de biocontrole de *S. sclerotiorum* por *Trichoderma* spp. (Meyer et al., 2016), conduzidos em diferentes municípios.

Outras causas de variação de resultados podem ser melhor controladas, e são relacionadas aos procedimentos de laboratório que verificam a eficiência dos tratamentos biológicos. A eficiência de agentes de biocontrole na inviabilização de escleródios de *S. sclerotiorum* na cultura da soja vem sendo avaliada desde 2012, pela rede de ensaios cooperativos de controle biológico de mofo-branco, conduzidos por pesquisadores de diversas instituições de pesquisa e experimentação no Brasil. Este capítulo apresenta o método empregado nesses ensaios, repetidamente testada e aperfeiçoada. Aqui, é dada ênfase à padronização dos procedimentos de campo e de laboratório, para minimizar erros experimentais e garantir a robustez de resultados.

### Produção de escleródios em laboratório

Os escleródios de *S. sclerotiorum* utilizados nos ensaios cooperativos são produzidos em laboratório, com o objetivo de obter escleródios livres de possíveis contaminações por agentes de controle biológicos provenientes do campo. A produção dos escleródios geralmente é feita em grãos de feijão ou em grãos de aveia, autoclavados.

Para produção de escleródios em grãos de feijão, adota-se a metodologia adaptada de Garcia et al. (2012). São utilizados frascos de vidro com tampa rosqueada tipo Schott-Duran (cap. 500 mL) ou Erlenmeyers de 250 mL, nos quais são adicionados 100 g de grãos de feijão umedecidos com 10 mL de água, autoclavando por 20 minutos a 120 °C. Após repouso de 24 horas, adiciona-se aos grãos de feijão autoclavados, cinco discos de micélio de *S. sclerotiorum* oriundos de colônias multiplicadas em meio BDA, a 24 °C, por cinco dias. Os frascos são mantidos a 20 °C, fotoperíodo de 12 horas, até a formação dos escleródios (cerca de 30 dias). Nos três primeiros dias após a repicagem dos discos de micélio de *S. sclerotiorum*, observar se há produção de micélio branco abundante, que indica a colonização dos grãos por *S. sclerotiorum*. Caso contrário, recomenda-se aumentar cuidadosamente a umidade dos grãos, adicionando de 1 a 2 mL de água destilada autoclavada, evitando-se o empoçamento de água no fundo dos frascos. Deve-se homogeneizar o crescimento micelial na massa de feijão diariamente, por meio de agitação manual cuidadosa dos frascos por 30 segundos. Caso os frascos não sejam agitados, em poucos dias há formação de uma massa compacta de micélio, grãos e posteriormente escleródios, que dificilmente são separados.

Para produção de escleródios em grãos de aveia, utiliza-se 300 g de grãos de aveia em casca, em frascos Schott-Duran (cap. 1000 mL), adiciona-se 250 mL de água, autoclavando duas vezes por 30 minutos a 120 °C, em intervalos de 24 horas. Após repouso de 24 horas, adiciona-se à aveia autoclavada, 10 discos de micélio de *S. sclerotiorum* oriundos de colônias multiplicadas em meio BDA, a 24 °C, por cinco dias. Os frascos são mantidos a 20 °C, fotoperíodo de 12 horas, até a formação dos escleródios (cerca de 25 dias). Nos três primeiros dias após a repicagem dos discos de micélio de *S. sclerotiorum*, deve-se homogeneizar o crescimento micelial na massa de feijão, por meio de agitação manual suave dos frascos por 30 segundos, a intervalos de 12 horas. Esse método pode ser adaptado, utilizando-se sacos plásticos autoclaváveis em substituição aos frascos Schott-Duran<sup>®</sup>, visando aumentar o volume de produção de escleródios.

### Instalação do ensaio a campo

Os ensaios são conduzidos em área de lavoura de soja, em sistema de semeadura direta sobre palha, com uniforme cobertura de solo com palhada de gramínea, como aveia, trigo, cevada, milheto, braquiária, etc. O delineamento experimental utilizado é o de blocos casualizados, com parcelas de seis linhas de 6 m e quatro repetições, considerando-se como parcela útil as quatro linhas de 5 m centrais.

Amostras contendo 30 escleródios são colocadas em sacos de tela de náilon com malha inferior a 1,0 mm (Figura 1) e dispostas em bandejas de isopor (tipo marmitta), com o fundo perfurado (Figura 2), para garantir a drenagem da água da chuva. As bandejas são preenchidas com solo de barranco ou subsolo ou solo autoclavado. Não é utilizado solo da lavoura para evitar contaminação com populações nativas de *Trichoderma* spp.

As bandejas são distribuídas no centro das parcelas e acomodadas de forma que metade de sua altura fique abaixo da superfície do solo. Cada bandeja receberá um saquinho de tela contendo os escleródios (Figura 3), que deverá ser levemente afundado no solo no centro da bandeja, de forma que sua face superior fique nivelada com a superfície do solo da bandeja.

Em seguida, cada bandeja receberá uma cobertura uniforme de palhada picada (Figura 4). Essa cobertura deverá ser proveniente da gramínea utilizada como cobertura de solo, devendo-se utilizar apenas as partes aéreas da mesma, que não tenham tido contato com o solo. Regar as bandejas com água, após a cobertura com palha, para a acomodação da mesma na superfície do solo e garantia de umidade para os escleródios.

Fotos: Maurício Comrado Meyer



Figura 1. Saquinhos de tela de náilon com malha inferior a 1,0 mm, contendo amostras de escleródios

Fotos: Maurício Comrado Meyer



Figura 2. Bandejas de isopor (tipo marmitta) perfuradas no fundo

Os tratamentos são aplicados com as plantas de soja em estágio V2 e V4, em dias nublados ou chuvosos, ou no final da tarde (a condição ideal é a de ocorrência de chuva logo após a aplicação). Para as pulverizações são utilizados pulverizador pressurizado por  $\text{CO}_2$ , composto por barra com quatro pontas de jato plano e calibrado para vazão de 150 litros de calda por hectare. Entre as aplicações de cada tratamento deve-se realizar uma boa lavagem do interior do pulverizador, esgotando-se um frasco (garrafa pet) de 2,0 L de água. Essa lavagem do interior do equipamento de pulverização deve ser realizada fora da área do ensaio, com direção do vento contrária ao experimento.





Fotos: Maurício Conrado Meyer

Figura 3. Posicionamento da amostra de escleródios na bandeja



Fotos: Maurício Conrado Meyer

Figura 4. Cobertura das bandejas com palhada de gramínea

### Avaliação da viabilidade dos escleródios

O efeito dos tratamentos de biocontrole sobre a viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum* é avaliado pelos pesquisadores que conduzem os ensaios, em seus respectivos laboratórios, para evitar possível interferência do transporte nos resultados.

As amostras de escleródios são recolhidas aos 20 dias após a última aplicação de biofungicidas, quando a soja se encontra entre os estádios V6 e V7 de desenvolvimento, acondicionando-se individualmente cada saquinho de tela em sacos de papel devidamente limpos, identificados e imediatamente encaminhadas ao laboratório.

### Germinação carpogênica, colonização por *Trichoderma* spp. e viabilidade dos escleródios

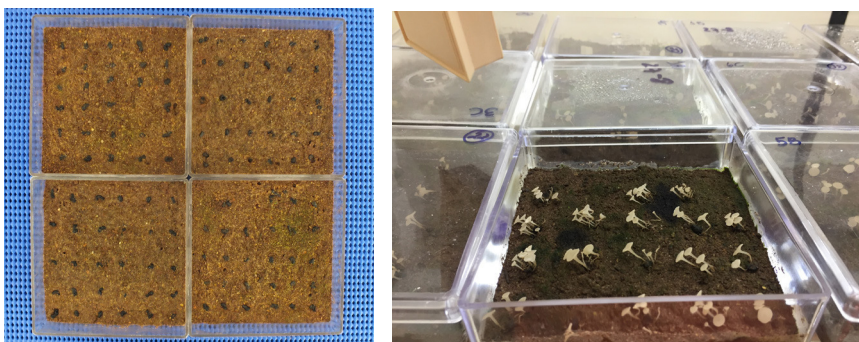
As avaliações de viabilidade dos escleródios são realizadas em caixas de acrílico tipo Gerbox transparente (11 x 11 x 3,5 cm), contendo aproximadamente 200 g de solo de barranco autoclavado, umedecido até atingir 90% da capacidade de campo. São avaliados todos os 30 escleródios de cada amostra (120 escleródios por tratamento).

Em cada caixa Gerbox os escleródios são dispostos em esquema 6 X 5 na superfície do solo, fazendo-se uma leve pressão para que se acomodem e mantenham a mesma posição (Figura 5). Não é feita nenhuma assepsia dos escleródios, mas as caixas devem ser cobertas com suas devidas tampas. Tampas arranhadas ou foscas devem ser evitadas, pois a formação de apotécios precisa de luz. Em seguida, as caixas Gerbox são incubadas em câmaras com temperatura de 19 °C ( $\pm 2$  °C) e fotoperíodo de 12 horas (duas lâmpadas fluorescentes brancas de 20W ou LED de 9W e uma lâmpada de luz negra 15W). É importante padronizar a iluminação no ambiente de incubação, de modo que todas as caixas com escleródios recebam a mesma intensidade luminosa. Esta padronização pode ser feita contando-se com lâmpadas da mesma idade, sendo que lâmpadas fluorescentes brancas podem ser substituídas por lâmpadas LED. A germinação carpogênica deverá começar num período de 20 a 30 dias com a formação de estipes, e de apotécios normalmente a partir dos 40 dias, quando então as leituras deverão ser realizadas (Figura 6).

Parâmetros avaliados:

- Percentual de germinação carpogênica (escleródios com apotécios ou estipes);
- Percentual de escleródios colonizados por *Trichoderma* spp. (avaliação visual);
- Percentual de escleródios inviáveis (podres) - apertar com pinça para avaliar se estão íntegros (firmes) ou podres (moles). Considerar os podres como inviáveis.

Fotos: Maurício Conrado Meyer



**Figura 5.** Acondicionamento dos escleródios em gerbox com solo umedecido a 90% da capacidade de campo, incubados a 19 °C ( $\pm 2$  °C) e fotoperíodo de 12 horas



**Figura 6.** Aspectos da análise de viabilidade de escleródios sadios (esquerda da linha vermelha) e colonizados por agentes de biocontrole (direita da linha vermelha)

### Germinação miceliogênica

A avaliação da capacidade de germinação miceliogênica dos escleródios não é mais realizada nos ensaios cooperativos de controle biológico de mofo-branco em soja desde 2015, pois os resultados constantemente indicam não haver redução desse tipo de germinação em função dos tratamentos com biofungicidas. Esse fato revela que um mínimo de reserva remanescente nos escleródios, mesmo que parasitados por *Trichoderma* spp. é suficiente para gerar micélio de *S. sclerotiorum*. Entende-se, inclusive, que a germinação miceliogênica tem pouca importância epidemiológica na cultura da soja.

Para as avaliações de germinação miceliogênica são utilizados 20 escleródios por amostra (80 escleródios por tratamento), não desinfestados para não interferir na avaliação da incidência de *Trichoderma* spp. Posteriormente, os escleródios são depositados em placas de Petri (cinco escleródios por placa), contendo meio de cultura BDA modificado para uma concentração reduzida em 1/3 dos ingredientes batata e dextrose, acidificado com ácido láctico para pH 4,0 (BDA pobre acidificado). Ao meio ainda fundente é adicionado 250  $\mu$ l de dispersante Triton e 0,2 g de antibiótico oxitetraciclina (pode ser substituído por estreptomicina), por litro de meio. As placas com os escleródios são incubadas a 23 °C e ausência de luz, sendo a primeira avaliação realizada aos cinco dias após o início da incubação e, a segunda, aos 10 dias. A germinação miceliogênica dos escleródios é expressa em percentual de escleródios que geraram micélio de *S. sclerotiorum*. Pode-se ainda avaliar o percentual de escleródios colonizados por *Trichoderma* spp. e a integridade dos escleródios (% de escleródios inviáveis).



## Referências

- AGROFIT: consulta aberta. Brasília, DF: Mapa, c 2003. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: abr. 2019.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v. 16, p. 93-108, 1994.
- GARCIA, R. A.; JULIATTI, F. C.; CASSEMIRO, T. A. produção de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em meio de cultura. *Bioscience Journal*, v. 28, n. 1, p. 1-7, Jan./Feb. 2012.
- GHAZANFAR, M. U.; RAZA, M.; RAZA, W.; QAMAR, M. I. Trichoderma as potential biocontrol agent, its exploitation in agriculture: a review. *Plant Protection*, v. 2, n. 3, p. 109-135, 2018.
- JACCOUD FILHO, D. S.; NASSER, L. C. B.; HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E. M. G.; JULIATTI, F. C. Mofó-branco: introdução, histórico, situação atual e perspectivas. In: JACCOUD FILHO, D. S.; HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E. M. G. (Eds.). **Mofó-branco**. Ponta Grossa: Todapalavra, 2017. p. 29-73.
- LOBO JUNIOR, M.; LOPES, C. A.; SILVA, W. L. C. Sclerotinia rot losses in processing tomatoes grown under centre pivot irrigation in central Brazil. *Plant Pathology*, v. 49, p. 51-56, 2000.
- LOBO JUNIOR, M.; SILVA-ABUD, L. L. S.; SANTOS-GOULART, P. F.; MACEDO, R.; TOLEDO-SOUZA, E. D. Panorama da pesquisa com patógenos radiculares no Brasil. In: LOPES, U. P.; MICHEREFF, S. J. (Ed.). **Desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2018. p. 17-34.
- MEYER, M. C.; FERREIRA, L. C.; BAYLÃO, B. S. G.; COSTA, N. B.; GUERZONI, R. A.; PIMENTA, C. B.; NUNES JÚNIOR, J.; VENANCIO, W. S. Influência do nível de água no solo sobre a germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum*. *Tropical Plant Pathology*, v. 35 p. S153, 2010. Suplemento.
- MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; GODOY, C. V.; UTIAMADA, C. M. (Eds.). **Ensaio cooperativos de controle biológico de mofó branco na cultura da soja - safras 2012 a 2015**. Londrina: Embrapa Soja, 2016. 46 p. (Embrapa Soja, Documentos, 368).
- PELTIER, A. J.; BRADLEY, C. A.; CHILVERS, M. I.; MALVICK, D. K.; MUELLER, D. S.; WISE, K. A.; ESKER, P. D. Biology, yield loss and control of *Sclerotinia* Stem Rot of Soybean. *Journal of Integrated Pest Management*, v. 3, n. 2, p. B1-B7, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1603/IPM11033>.