

Evaluación en campo del efecto de *Trichoderma* sobre la pudrición blanca

Maurício Conrado Meyer

Hercules Diniz Campos

Murillo Lobo Junior

Introducción

El hongo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary es el agente causal de la pudrición blanca, una enfermedad de importancia mundial, que afecta la productividad de varios cultivos como la soja [(*Glycine max* (L.) Merr.], frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), canola (*Brassica napus* L.), algodón (*Gossypium hirsutum* L.), maní (*Arachis hypogaea* L.), papa (*Solanum tuberosum* L.), girasol (*Helianthus annuus* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), guisante (*Pisum sativum* L.), entre otros (Boland; Hall 1994; Lobo Junior et al., 2000; Jaccoud Filho et al., 2017).

El patógeno produce estructuras de supervivencia llamadas esclerocios, que permanecen en el suelo y son la principal fuente de inóculo de la pudrición blanca. En condiciones de alta humedad del suelo, temperaturas alrededor de 15 y 20 °C y suelos bajo sombra, los esclerocios germinan produciendo estructuras infectivas (micelio o ascosporas) capaces de desencadenar la enfermedad en las plantas hospedantes (Meyer et al., 2010; Peltier; et al., 2012; Jaccoud Filho et al., 2017).

El manejo de la pudrición blanca requiere la adopción conjunta tanto de medidas culturales, así como el uso de fungicidas y agentes de control biológico, con el fin de prevenir y controlar la enfermedad en las plantas y reducir la cantidad de inóculo (Meyer et al., 2016). La reducción de la población de esclerocios (fuente del inóculo inicial) en el suelo es un elemento clave para el manejo integrado de la enfermedad.

El control biológico de *S. sclerotiorum* es hecho principalmente a través de la acción de microorganismos que parasitan y degradan los esclerocios en el suelo, reduciendo la densidad de inóculo del patógeno en las áreas infestadas. Entre estos microorganismos, los más

utilizados en Brasil se encuentran algunas especies del hongo *Trichoderma* y de la bacteria *Bacillus* y ya hay más de 30 productos registrados y disponibles en el mercado (Meyer et al., 2016; Agrofitt, 2003c).

La acción de *Trichoderma* spp. depende en gran medida de las condiciones ambientales favorables para su establecimiento en el suelo, lo que puede limitar su eficiencia en el control de fitopatógenos (Lobo Junior. et al., 2018; Ghazanfar et al., 2018). Esta condición es la principal causa de las variaciones en los resultados en los experimentos sobre la eficiencia del biocontrol de *S. sclerotiorum* por parte de *Trichoderma* spp. (Meyer et al., 2016), realizadas en diferentes municipios.

Otras causas de variación en los resultados pueden ser mejor controladas pues están relacionadas con los procedimientos de laboratorio para verificar la eficacia de los tratamientos biológicos. La eficiencia de los agentes de biocontrol en la prevención de esclerocios de *S. sclerotiorum* en cultivos de soja ha sido evaluada desde 2012 por la red de ensayos cooperativos para el control biológico de la pudrición blanca, realizada por investigadores de varias instituciones de investigación y experimentación del Brasil. Este capítulo presenta el método utilizado en estos ensayos, repetidamente probado y mejorado. Aquí, se hace hincapié en la estandarización de los procedimientos de campo y laboratorio para minimizar los errores experimentales y garantizar la robusticidad de los resultados.

Producción de esclerocios en el laboratorio

Los esclerocios de *S. sclerotiorum* utilizados en los ensayos cooperativos son producidos en laboratorio, con el objetivo de obtener esclerocios libres de posible contaminación por agentes de control biológico de campo. La producción de esclerocios se suele hacer sobre semillas de frijol o granos de avena, esterilizados en autoclave.

Para la producción de esclerocios sobre semillas de frijol se utilizó la metodología adaptada de García et al. (2012). Se utilizan frascos de vidrio con tapa rosca Schott-Duran (capacidad de 500 mL) o Erlenmeyers de 250 mL, en los cuales se agregan 100 g de semillas de frijol humedecidos con 10 mL de agua y sometidos a autoclave durante 20 minutos a 120 °C. Después de 24 horas de reposo, se agregan a las semillas de frijol autoclavados cinco discos de micelio de *S. sclerotiorum* provenientes de las colonias multiplicadas en medio PDA a 24 °C durante cinco días. Los frascos son mantenidos a 20 °C, fotoperiodo de 12 horas, hasta la formación de esclerocios (alrededor de 30 días). Durante los primeros tres días posteriores al subcultivo de los discos de micelio de *S. sclerotiorum* se debe observar si hay producción de abundante micelio blanco, lo que indica la colonización de las semillas por *S. sclerotiorum*. En caso contrario, se recomienda aumentar cuidadosamente la humedad de las semillas, agregando de 1 a 2 mL de agua destilada esterilizada en autoclave, evitando la acumulación del

agua en el fondo de los frascos. El crecimiento micelial sobre el frijol debe ser homogeneizado diariamente, mediante una cuidadosa agitación manual de los frascos durante 30 segundos. Si no se agitan los frascos, en pocos días se forma una masa compacta de micelio, granos y posteriormente esclerocios, que son difíciles de separar.

Para la producción de esclerocios en granos de avena se utilizan 300 g de granos de avena en cáscara, en frascos Schott-Duran (de capacidad de 1000 mL), se agregan 250 mL de agua y se somete dos veces a autoclave durante 30 minutos a 120 °C, a intervalos de 24 horas. Después de 24 horas de reposo, se añaden a la avena autoclavada 10 discos de micelio de *S. sclerotiorum* de las colonias multiplicadas en medio PDA a 24 °C durante cinco días. Los frascos son mantenidos a 20 °C, fotoperiodo de 12 horas, hasta la formación de esclerocios (alrededor de 25 días). Durante los primeros tres días después del subcultivo de los discos de micelio de *S. sclerotiorum*, el crecimiento del micelio en la masa de avena debe homogeneizarse agitando suavemente los matraces de manera manual durante 30 segundos, a intervalos de 12 horas. Este método se puede adaptar, utilizando bolsas de plástico esterilizables en autoclave en lugar de botellas de Schott-Duran®, con el objetivo de aumentar el volumen de producción de esclerocios.

Instalación del ensayo en campo

Los ensayos fueron realizados en campos de soja, con un sistema de siembra directa sobre paja, con cobertura uniforme del suelo con restos de gramíneas, como avena, trigo, cebada, mijo, braquiaria, etc. El diseño experimental utilizado fue de bloques al azar, con parcelas de seis líneas de 6 m y cuatro repeticiones, considerándose como parcela útil las cuatro líneas centrales de 5 m.

Las muestras que contenían 30 esclerocios fueron colocadas en bolsas de tela de nylon con un tamaño de malla inferior a 1,0 mm (Figura 1) y se colocan en bandejas de espuma de poliestireno (tipo lunch box), con fondo perforado (Figura 2), para asegurar el drenaje del agua de lluvia. Las bandejas fueron rellenas con tierra de laderas, subsuelo o tierra autoclavada. No se utiliza suelo del cultivo para evitar la contaminación con poblaciones nativas de *Trichoderma* spp.

Las bandejas se distribuyen en el centro de las parcelas y se disponen de manera que la mitad de su altura quede por debajo de la superficie del suelo. Cada bandeja debe contener una bolsa de tela conteniendo los esclerocios (Figura 3), la cual deberá estar ligeramente hundida en el suelo en el centro de la bandeja, de modo que la cara superior quede a nivel de la superficie del suelo de la bandeja.

Luego, cada bandeja recibirá una cubierta uniforme de paja picada (Figura 4). Esta cubierta debe provenir de la gramínea utilizada como cobertura del suelo y solo debe utilizarse

las partes aéreas que no hayan tenido contacto con el suelo. Posteriormente se debe regar las bandejas con agua, después de haberla cubierto con la paja para acomodar la misma en la superficie del suelo y garantizar la humedad para los esclerocios.



Figura 1. Bolsas de nylon con un tamaño de malla inferior a 1,0 mm que contienen muestras de esclerocios.



Figura 2. Bandejas de espuma de poliestireno (tipo lunch box) perforadas en la parte inferior.

Los tratamientos se aplican con plantas de soja que estén en los estadios V2 y V4, en días nublados o lluviosos o al final de la tarde (la condición ideal es la ocurrencia de lluvias poco después de la aplicación). Para la aplicación se utiliza un aspersor a presión de CO₂, compuesto por una barra con cuatro boquillas planas y calibrado para un caudal de 150 litros de aplicación por hectárea. Entre

cada aplicación de cada tratamiento, se debe lavar a fondo el interior del pulverizador, vaciando una botella de 2,0 L (botella pet) de agua. Este lavado del interior del equipo de aspersión debe realizarse fuera del área de ensayo, en dirección del viento contraria al experimento.



Fotos: Mauricio Contrado Meyer

Figura 3. Colocación de la muestra de esclerocios en la bandeja



Fotos: Mauricio Contrado Meyer

Figura 4. Cubertura de las bandejas con paja de gramíneas

Evaluación de la viabilidad de los esclerocios

El efecto de los tratamientos de biocontrol sobre la viabilidad de los esclerocios de *S. sclerotiorum* es evaluado por los investigadores que realizan los ensayos, en sus respectivos laboratorios, para evitar posibles interferencias del transporte en los resultados.

Las muestras de esclerocios se recolectan 20 días después de la última aplicación del biofungicida, cuando la soya se encuentra entre las etapas de desarrollo V6 y V7, y cada bolsa de tela es colocada de manera individual en bolsas de papel limpias, identificada y enviada inmediatamente al laboratorio.

Germinación carpogénica, colonización por *Trichoderma* spp. y viabilidad de los esclerocios

Las evaluaciones de viabilidad de los esclerocios se realizan en cajas acrílicas tipo Gerbox transparentes (11 x 11 x 3,5 cm) que contienen aproximadamente 200 g de suelo de ladera esterilizado en autoclave, humedecido hasta alcanzar el 90% de capacidad de campo. Se evalúan los 30 esclerocios de cada muestra (120 esclerocios por tratamiento).

En cada caja Gerbox, los esclerocios se disponen en un patrón de 6 x 5 sobre la superficie del suelo, aplicando una ligera presión para acomodarlos y mantener la misma posición (Figura 5). No se hace ningún tipo de asepsia de los esclerocios, pero las cajas deben cubrirse con las tapas adecuadas. Se deben evitar las tapas rayadas o con fondos mate ya que la formación de apotecios requiere de luz. Luego, las cajas Gerbox son incubadas en cámaras climáticas a una temperatura de 19 °C (± 2 °C) y un fotoperiodo de 12 horas (dos lámparas fluorescentes blancas de 20W o LED de 9W y una lámpara de luz negra de 15W). Es importante estandarizar la iluminación en el ambiente de incubación, para que todas las cajas con esclerocios reciban la misma intensidad de luz. Esta estandarización se puede hacer usando en lámparas con el mismo tiempo de uso y las lámparas fluorescentes blancas se pueden reemplazar por lámparas LED. La germinación carpogénica debe iniciarse en un período de 20 a 30 días con la formación de estipes y los apotecios normalmente a los 40 días, cuando se deben realizar las lecturas (Figura 6).

Parámetros evaluados:

- Porcentaje de germinación carpogénica (esclerocios con apotecios o estipes);
- Porcentaje de esclerocios colonizados por *Trichoderma* spp. (evaluación visual);
- Porcentaje de esclerocios no viables (podridos) - apretar con pinzas para evaluar si están intactos (firmes) o podridos (blandos). Considere los podridos como inviables.

Fotos: Mauricio Contrato Meyer



Figura 5. Acondicionamiento de los esclerocios en cajas Gerbox con suelo humedecido al 90% de la capacidad de campo, incubados a 19°C (± 2 °C) y fotoperiodo de 12 horas.



Fotos: Maurício Conrado Meyer

Figura 6. Aspectos del análisis de viabilidad de esclerocios sanos (a la izquierda de la línea roja) y colonizados por agentes de biocontrol (a la derecha de la línea roja).

Germinación micelológica

Desde 2015, la evaluación de la capacidad de germinación micelológica de los esclerocios ya no se realiza en ensayos cooperativos de control biológico de la pudrición blanca en soja, ya que los resultados indican constantemente que no hay reducción en este tipo de germinación como resultado de tratamientos con biofungicidas. Este hecho revela la existencia de un mínimo de reserva en los esclerocios que, aun estando parasitados por *Trichoderma* spp., es suficiente para generar micelio de *S. sclerotiorum*. Esto comprueba que la germinación del micelio tiene poca importancia epidemiológica en el cultivo de soja.

Para las evaluaciones de germinación micelológica son utilizados 20 esclerocios por muestra (80 esclerocios por tratamiento), no desinfectados para así no interferir en la evaluación de la incidencia de *Trichoderma* spp. Posteriormente, los esclerocios son colocados en cajas Petri (cinco esclerocios por caja), que contienen medio de cultivo PDA modificado a una concentración reducida de 1/3 de los ingredientes papa y dextrosa, acidificado con ácido láctico hasta un pH 4,0 (PDA pobre acidificado). Se añaden 250 µl de dispersante Triton y 0,2 g de antibiótico oxitetraciclina (puede sustituirse por estreptomycin) por litro de medio aún sin solidificar. Las placas con los esclerocios son incubadas a 23 °C en ausencia de luz y la primera y segunda evaluación son hechas a los 5 y 10 días después del inicio de la incubación.

La germinación miceliogénica de los esclerocios se expresa en porcentaje de esclerocios que generaron micelio de *S. sclerotiorum*. También es posible evaluar el porcentaje de esclerocios colonizados por *Trichoderma* spp. y la integridad de los esclerocios (% de esclerocios no viables).

Referencias

- AGROFIT: consulta abierta. Brasília, DF: Mapa, c 2003. Disponible en: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agro_fit_cons>. Acceso en: 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, ene/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. Mofa-branco: introdução, histórico, situação atual e perspectivas. In: JACCOUD FILHO, D. S.; HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E. M. G. (Eds.). **Mofa-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. E.; 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.). **Ensaíos cooperativos de controle biológico de mofa 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>.