

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM ÁREAS  
DE ROTAÇÃO DE CULTURAS**

**CATIRENE FERNANDES SILVA**

**Dourados  
Mato Grosso do Sul - Brasil  
2018**

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM ÁREAS  
DE ROTAÇÃO DE CULTURAS**

**CATIRENE FERNANDES SILVA**

Orientadora: PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> LILIAN MARIA ARRUDA BACCHI

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Federal da Grande Dourados,  
como pré-requisito para obtenção do título de  
Engenheira Agrônoma.

**Dourados**  
**Mato Grosso do Sul - Brasil**  
**2018**

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM ÁREAS  
DE ROTAÇÃO DE CULTURAS**

**CATIRENE FERNANDES SILVA**

Monografia apresentada como parte dos requisitos exigidos pela graduação em Agronomia, para obtenção do título de **Engenheira Agrônoma**.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lilian Maria Arruda Bacchi  
Orientadora UFGD

---

Prof. Ph.D. Walber Luiz Gavassoni  
Banca Examinadora - UFGD

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elaine Reis Pinheiro Lourente  
Banca Examinadora - UFGD

*Aos meus pais,*

*Izade Fernandes Barbosa e Joana Corrêa da Silva,*

Por todo amor, confiança e coragem transmitidos durante toda a minha jornada. Por todo apoio, as oportunidades, os ensinamentos herdados. À toda minha formação ética e moral, aos princípios intrínsecos a minha pessoa.

Amo-os de todo o meu Ser e, não há definições para expressar meus verdadeiros sentimentos e sinceros agradecimentos.

*Dedico!*

*A mi cariño,*

*Juan José Mamani Palle,*

Por toda la amistad y el compañerismo.

*Ofereço.*

## AGRADECIMENTOS

À DEUS, primeiramente e à Nossa Senhora Aparecida por Guiar e Iluminar meus Caminhos e Mente;

À Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) e à Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) pela formação;

À Professora Dra Lilian Maria Arruda Bacchi, pela orientação e, dedicação;

Ao Engenheiro Agrônomo e Técnico de Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia (FCA/UFGD) Bruno César Álvaro Pontim pela ajuda nos procedimentos de laboratório;

Ao Professor Dr. Luiz Carlos Ferreira de Souza, por disponibilizar a área de rotação de culturas para coleta das amostras de solos;

Aos Professores Walber Luiz Gavassoni e Elaine Reis Pinheiro Lourente por aceitar o convite e, compor a banca examinadora de minha monografia;

Ao Programa de Educação Tutorial (PET);

Ao Programa de Mobilidade Acadêmica Regional em Cursos Acreditados (MARCA);

À todos os Professores que participaram de minha formação, de nível fundamental, médio e ensino superior;

À todos familiares e padrinhos;

À todos os amigos de infância, escola e graduação. Em especial a senhorita e futura Química Maria Fernanda Ferreira de Jesus;

À todos que contribuíram direta e indiretamente para conclusão dessa importante etapa de minha vida.

*Muito Obrigada!*

*O Cio da Terra*

*Debulhar o trigo  
Recolher cada bago do trigo  
Forjar no trigo o milagre do pão  
E se fartar de pão*

*Decepar a cana  
Recolher a garapa da cana  
Roubar da cana a doçura do mel  
Se lambuzar de mel*

*Afagar a terra  
Conhecer os desejos da terra  
Cio da terra, propícia estação  
E fecundar o chão*

[...]

Compositor: Milton Silva Campos do Nascimento

## SUMÁRIO

	PÁGINA
LISTA DE QUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1. Mofo branco.....	03
2.1.1. Histórico.....	03
2.1.2. Etiologia e sintomatologia.....	03
2.1.3. Ciclo da doença e epidemiologia.....	04
2.1.4. Métodos de manejo.....	05
2.2. Antagonista como agente de controle biológico.....	05
2.2.1. <i>Trichoderma</i> sp.....	05
2.3. Mecanismos de ação do fungo antagonista <i>Trichoderma</i> sp. como agente de biocontrole para <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	06
2.3.1. Micoparasitismo.....	06
2.3.2. Competição.....	06
2.3.3. Antibiose.....	06
2.3.4. Indução de resistência.....	07
2.4. Rotação de Culturas.....	07
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	08
3.1. Aquisição e manutenção de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	08
3.2. Produção de escleródios.....	09
3.3. Coleta de Solos de Sistema de Rotação de Culturas.....	09
3.4. Aquisição de Antagonistas.....	10
3.5. Ágar-água.....	11
3.6. Tratamentos.....	11
3.7. Avaliações.....	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13

4.1. Percentagem de escleródios germinados.....	13
4.2. Estipes.....	15
4.3. Estipes por Escleródio.....	20
4.4. Apotécios.....	24
4.5. Apotécios por Escleródio.....	26
5. CONCLUSÕES.....	29
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30



## LISTA DE QUADROS

	PÁGINA
<b>Quadro 1.</b> Sistema de Sucessão de Culturas de espécies agrícolas para produção de grãos. Fazenda Experimental de Ciências Agrárias - UFGD - Dourados-MS.....	10
<b>Quadro 2.</b> Germinação carpogênica de escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> sob o efeito dos solos de sistemas de rotação de culturas e, em decorrência da aplicação de Native®. Dourados-2018.....	15
<b>Quadro 3.</b> Número médio de estipes produzidas por escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> sob o efeito dos solos de sistemas de rotação de culturas e, em decorrência da aplicação de Native®. Dourados-2018.....	16
<b>Quadro 4.</b> Número médio de estipes produzidas por escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> em decorrência dos solos de sistemas de rotação de culturas aos 33, 40, 47, 54 e 61 dias após a incubação (DAI). Dourados-2018.....	17
<b>Quadro 5.</b> Número médio de estipes produzidas por escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> sob o efeito da Aplicação de Native® nos períodos de avaliações aos 33, 40, 47, 54 e 61 dias após a incubação (DAI). Dourados-2018.....	19
<b>Quadro 6.</b> Número médio de estipes formadas por escleródio de <i>S. sclerotiorum</i> sob o efeito dos solos de sistemas de rotação de culturas e, em decorrência da aplicação de Native®. Dourados-2018.....	20
<b>Quadro 7.</b> Número médio de estipes formadas por escleródio de <i>S. sclerotiorum</i> em decorrência dos solos de sistema de rotação de culturas aos 33, 40, 47, 54 e 61 dias após a incubação (DAI). Dourados-2018.....	21
<b>Quadro 8.</b> Número médio de estipes produzidas por escleródio de <i>S. sclerotiorum</i> sob o efeito da Aplicação de Native® nos períodos de avaliações aos 33, 40, 47, 54 e 61 dias após a incubação (DAI). Dourados-2018.....	23

<b>Quadro 9.</b> Número médio de apotécios formados por escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> sob o efeito dos solos de sistemas de rotação de culturas. Dourados-2018.....	25
<b>Quadro 10.</b> Número médio de apotécios formados por escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> sob o efeito da Aplicação de Native® nos períodos de avaliações aos 33, 40, 47, 54 e 61 dias após a incubação (DAI). Dourados-2018.....	25
<b>Quadro 11.</b> Número médio de apotécios por escleródio germinado de <i>S. sclerotiorum</i> em decorrência dos solos de sistemas de rotação de culturas aos 33, 40, 47, 54 e 61 dias após a incubação (DAI). Dourados-2018.....	27

## LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
<b>Figura 1.</b> A: Discos de cenouras não autoclavados em erlenmeyers. B: Patógeno repicado para erlenmeyers com discos de cenoura em processo de incubação a 25 °C para formar escleródios.....	09
<b>Figura 2.</b> Tratamentos testados no ensaio: A: Sem aplicação de Native® - a: soja e pousio; b: soja e milho; c: soja e milho com <i>Brachiaria ruziziensis</i> ; d: soja e aveia branca; e: milho e aveia branca; f: ágar-água. B: Com aplicação de Native® - a: soja e pousio; b: soja e milho; c: soja e milho com <i>Brachiaria ruziziensis</i> ; d: soja e aveia branca; e: milho e aveia branca; f: ágar-água.....	11
<b>Figura 3.</b> Germinação carpogênica de escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> incubados a 18 °C sob o efeito do tempo.....	13
<b>Figura 4.</b> Número de estipes produzidas por escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> incubados em solos de diferentes sistemas de rotação/sucessão de culturas em função do tempo.....	18
<b>Figura 5.</b> Número de estipes produzidas em função da aplicação e não aplicação do produto Native® ao longo do período de incubação.....	19
<b>Figura 6.</b> Número de estipes por escleródio produzidas por escleródio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> incubados em solos de diferentes sistemas de rotação/sucessão de culturas em função do tempo.....	22
<b>Figura 7.</b> Número de estipes produzidas por escleródio de <i>S. sclerotiorum</i> em função da aplicação e não aplicação do produto Native® ao longo do período de incubação.....	24
<b>Figura 8.</b> Número de apotécios produzidos por escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> em função da aplicação e não aplicação do produto Native® ao longo do período de incubação.....	26

**Figura 9.** Número de apotécios por escleródio produzidas por escleródio de *Sclerotinia sclerotiorum* incubados em solos de diferentes sistemas de rotação/sucessão de culturas em função do tempo..... 28

## RESUMO

FERNANDES-SILVA, C., Universidade Federal da Grande Dourados, Dezembro de 2018.

Controle Biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* em Áreas de Rotação de Culturas.

O presente trabalho teve por finalidade avaliar o efeito do fungicida microbiológico Native®, o qual contém o fungo *Trichoderma harzianum* e a bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* e, possíveis efeitos dos resíduos culturais de áreas de rotação de culturas sobre a germinação carpogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. As atividades foram realizadas no laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia da Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS. Foi desenvolvido ensaio com germinação carpogênica de escleródios de *S. sclerotiorum* sob delineamento experimental de blocos casualizados (DBC), cujo sistema de produção caracterizou-se por: soja e pousio, soja e milho, soja e milho com *Brachiaria ruziziensis*, soja e aveia branca e, milho e aveia branca. O tratamento ágar-água, foi estabelecido como testemunha, para cada tratamento havia seis repetições. Metade do experimento foi submetido a aplicação do produto Native® e, a outra metade não obteve aplicação de Native®. Escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* exposto ao solo coletado de áreas no sistema soja e aveia branca apresentou menor germinação carpogênica, porém, quando ocorreu a adição de Native® a germinação foi equivalente aos demais tratamentos. Ocorreu interação entre o produto Native® e o efeito dos solos dos sistemas de rotação de culturas na germinação carpogênica e produção de apotécio de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*.

**Palavras-chave:** Mofa branco, antagonismo, hiperparasitas, biocontrole.

## ABSTRACT

FERNANDES-SILVA, C.; Federal University of Grande Dourados, December 2018.  
Biological Control of *Sclerotinia sclerotiorum* in Areas of Rotation of Cultures.

The purpose of this study was to evaluate the effect of the Native® microbiological fungicide, which contains the fungus *Trichoderma harzianum* and the bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* and possible effects of cultural residues from crop rotation areas on the carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia. The activities were carried out in the Laboratory of Agricultural Microbiology and Phytopathology of the Federal University of Grande Dourados, Dourados, MS. An experiment was carried out with carpogenic germination of *S. sclerotiorum* sclerotia under a randomized block design, whose production system was characterized by: soybean and fallow, soybean and corn, soybean and corn with *Brachiaria ruziziensis*, soybean and white oats and corn and white oats. The agar-water treatment was established as a control, for each treatment there were six replicates. Half of the experiment was applied to the Native® product and the other half did not obtain Native® application. *Sclerotinia sclerotiorum* sclerodes exposed to the soil collected in soybean and white oat systems presented lower carpogenic germination, however, when the addition of Native® to germination occurred, it was equivalent to the other treatments. There was interaction between the Native® product and the soil effect of crop rotation systems on carpogenic germination and *Sclerotinia sclerotiorum* production of sclerotia.

**Keywords:** White mold, antagonism, hyperparasites, biocontrol.

## 1. INTRODUÇÃO

*Sclerotinia sclerotiorum* foi descrito pela primeira vez no Brasil, no Estado de São Paulo, na década de 20, na cultura da batata (CHAVES, 1964). O patógeno possui ampla distribuição geográfica a nível mundial. Os escleródios, suas estruturas de resistência, podem permanecer no solo por 6 a 8 anos (BIANCHINI et al., 2005).

De acordo com as relações patógeno-hospedeiro, o ciclo de *S. sclerotiorum* inicia-se na fase de sobrevivência, onde são produzidos os escleródios cuja a germinação pode ocorrer, por vias distintas, a germinação miceliogênica ou a germinação carpogênica (AGRIOS, 2005).

Quando ocorre a produção de hifas provenientes dos próprios escleródios, têm-se a germinação miceliogênica, por outro lado, a germinação carpogênica, dá-se com temperaturas que variam de 8-18 °C e quando ocorre a formação de apotécios, os quais formam vários corpos de frutificação, o que viabiliza enormemente a disseminação dos milhares de acosporos formados por essas estruturas (AGRIOS, 2005).

No tocante ao controle biológico, é tido como uma ciência que estuda as relações de equilíbrio entre as populações, embora, algumas práticas de manejo adotadas, estão diretamente conciliadas para utilização de controle biológico, como rotação de culturas, época de plantio e colheita ajustados de acordo com a necessidade, entre outros.

Com isso, os antagonistas a organismos fitopatogênicos são tidos como excelentes fontes de estudos, no que diz respeito a questões ambientais, como a não utilização de defensivos agrícolas e a preferência da população que anseia pela substituição da utilização desses produtos por métodos integrados de manejo.

Pode-se inferir que, o antagonismo do fungo *Trichoderma* sp. pode ocorrer por meio de um ou mais mecanismos associados, dentre eles, parasitismo, antibiose, competição e indução de resistência (COOK E BAKER, 1993).

A rotação de culturas pode-se destacar como importante no que infere-se ao manejo integrado de doenças e, também, por garantir melhor rentabilidade econômica por favorecer a produtividade das culturas além de auxiliar na preservação do solo e está intimamente relacionada à inúmeros benefícios como a quebra de ciclo de doenças,

diminuição da infestação por plantas daninhas, redução de insetos-pragas, melhoria das condições químicas, físicas e biológicas do solo.

O objetivo do presente trabalho é verificar os efeitos do fungicida microbiológico Native®, o qual contém o fungo *Trichoderma harzianum* e a bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* e, possíveis efeitos dos resíduos culturais de áreas de rotação de culturas sobre a germinação carpogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Mofo branco

#### 2.1.1. Histórico

O mofo branco é uma doença cujo fungo causador *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, polífago, segundo (BOLAND E HALL, 1994) possui mais de 400 plantas hospedeiras. É amplamente estudado devido a sua importância e aos prejuízos relacionados às dificuldades de manejo e controle.

O agente causal da doença é fungo necrotrófico, habitante do solo e, distribuído amplamente a nível mundial. É importante salientar que, no Brasil, em 1921, foi relatada a incidência da doença na cultura da batata (CHAVES, 1964). Para a cultura da Soja no Brasil, os relatos datam 1976, segundo (CASSETARI NETO et al., 2010).

No tocante aos prejuízos em função do ataque do patógeno, podem ser relatadas as perdas indiretas, relacionadas ao aumento do custo de produção em decorrência dos métodos de controle empregados e, sobremaneira a inviabilidade de áreas para produção de sementes. (PAULA JÚNIOR et al., 2010).

#### 2.1.2. Etiologia e Sintomatologia

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (sin. *Whetzelinia sclerotiorum*) pertence ao filo Ascomycota, classe Discomycetes, ordem Helotiales, família Sclerotiniaceae (BOLTON et al., 2006), não possui ciclo assexuado (MASSOLA JÚNIOR E KRUGNER, 2011), no entanto, pode ocorrer a produção de microconídios a partir de hifas ou apotécios, sem haver germinação.

Os escleródios são estruturas de resistência do patógeno que, são compostos por envelhecimento de hifas, inicialmente branca e, posteriormente de coloração enegrecida, resultado da presença de melanina, possivelmente essa pigmentação esteja relacionada à proteção contra condições desfavoráveis ao bom desenvolvimento dessa estrutura, a

qual possui formato e tamanho irregulares, o que varia de acordo com o hospedeiro. (BOLTON et al., 2006).

Dependendo das condições de temperatura e ambiente, os escleródios podem germinar de duas maneiras distintas, com germinação miceliogênica, a qual produz hifas ou ainda, germinação carpogênica que segundo (PAULA JÚNIOR et al., 2010), os escleródios geralmente passam por um período no solo e/ou restos culturais, a fim de garantir a sobrevivência do patógeno.

No que diz respeito à germinação miceliogênica, há a produção de hifas que penetram e colonizam seu hospedeiro. Sementes contaminadas com escleródios podem apodrecer e não germinar, (CANTERI et al., 1999) e (PAULA JÚNIOR et al., 2010), quando ainda germinam, essas plântulas, conseqüentemente morrem em seguida (CANTERI et al., 1999).

Segundo Paula Júnior et al., (2010), cada escleródio possui a capacidade de originar mais de 20 apotécios, onde são formados inúmeros ascos e, a partir desses, são produzidos os ascósporos. Esses ascos cujo período útil que pode variar de 5 a 10 dias podem ser liberados por um único apotécio mais de dois milhões de ascósporos.

### **2.1.3. Ciclo da doença e epidemiologia**

Sob temperaturas entre 10 a 21 °C e condições de alta umidade, os escleródios presentes no solo, germinam e desenvolvem os apotécios, onde o sombreamento colabora com os altos índices de umidade do solo, o que vem a justificar a “explosão” da doença por meio da contaminação de ascósporos em longos períodos de chuva e irrigação.

Para Bolton et al., (2006) e Paula Júnior et al., (2010) cada apotécio produz inúmeros ascos, os quais são formados milhões de ascosporos que são disseminados pelo vento e, quando sobrevive por até duas semanas, causam infecções primárias em seus hospedeiros.

Segundo Canteri et al., (1999), *S. sclerotiorum* pode ocorrer o crescimento de hifas inter e intracelularmente à penetração na planta hospedeira. Após, ocorrerá o enovelamento o qual originará outros escleródios, a contar 72 horas do crescimento do micélio, essas estruturas podem ser formadas.

#### 2.1.4. Métodos de manejo

No tocante ao manejo integrado da doença, pode fazer parte, o controle biológico, com excelentes perspectivas. Como agentes de controle biológico amplamente estudados, existem mais de 30 espécies, dentre os quais, fungos, bactérias, insetos e outros microrganismos que atuam como parasitas ou antagonistas do patógeno *S. sclerotiorum* (STEADMAN, 1979).

Como potenciais agentes de biocontrole apresentam-se espécies do gênero *Trichoderma*, cujas características de rápido crescimento micelial, alta produção de conídios e síntese de substâncias antimicrobianas e a capacidade de sobreviver como saprófita, simbiote ou micoparasita (ALVARENGA et al., 2007) contribuem para o sucesso do controle desse patógeno.

### 2.2. Antagonista como agente de controle biológico

#### 2.2.1. *Trichoderma* sp.

O gênero *Trichoderma* corresponde à fase anamorfica do genero *Hypocrea*, pertencente a classe dos fungos Mitosporicos, subclasse Hyphomycetes, ordem Moniliales, família Moniliaceae (SAMUEL, 1996).

A eficiência do fungo *Trichoderma* sp. como potencial agente antagonista, está sendo amplamente estudada e pesquisada, para Melo (1998), inúmeras espécies de *Trichoderma* sp. possui a habilidade de produzir antibióticos que impede a formação de propagulos de fitopatógenos.

O fungo *Trichoderma* sp. apresenta características morfológicas como micélio inicialmente branco de rápido crescimento e que, de acordo com o seu desenvolvimento pode vir a adquirir coloração verde, devido à alta quantidade de conídios na colônia e seu aspecto cotonoso. É importante considerar que a coloração da colônia está intimamente relacionada à quantidade de conídios e a pigmentação dos mesmos. (DOMSCH et al., 1980).

Os conídios desse fungo antagonista são unicelulares e, podem apresentar-se de inúmeras formas, dentre elas, subglobosa, ovoide, elípticacilíndrica ou elipsoide e textura podendo ser lisa ou rugosa cuja coloração verde-escuro é mais comum, quando

comparadas as colorações hialina ou verde-amarelo, essa coloração está em função do pH do meio (DOMSCH et al., 1980).

### **2.3. Mecanismos de ação do fungo antagonista *Trichoderma* sp. como agente de biocontrole para *Sclerotinia sclerotiorum***

#### **2.3.1. Micoparasitismo**

É característico quando o fungo antagonista cresce em direção ao patógeno, após detecção e localização das hifas dos mesmos por liberar estímulos químicos. As hifas do *Trichoderma* spp. então enrola-se no patógeno e após, penetra e digere a hifa.

De acordo com Harman et al. (2004) presume-se que entre 20 e 30 genes estejam relacionados a esse mecanismo, considerando proteínas e outros metabolitos. Para GIESE et al. (2008), o *Trichoderma* spp., secreta quitinases,  $\beta$ 1,3-glucanases e  $\beta$ 1,6-glucanases para inibir o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos.

#### **2.3.2. Competição**

Quando há a interação entre dois indivíduos ou mais a fim de competir geralmente por oxigênio, espaço e nutrientes. No entanto, a comprovação desse mecanismo, é difícil de ser realizada experimentalmente. Segundo Ethur (2006), a competição para o *Trichoderma* sp. é uma medida de biocontrole para garantir a capacidade de desenvolvimento na rizosfera.

#### **2.3.3. Antibiose**

Há a interação entre organismos, onde um sofre ação danosa, como inibir o crescimento ou a germinação e até a morte do hospedeiro, devido aos metabolitos produzidos pelo outro organismo. Segundo Bastos (1991), das substâncias produzidas *Trichoderma* sp. com capacidade inibitória do desenvolvimento de outros fungos fitopatogênicos, pode-se inferir, gliotoxina, viridina e trichodermina.

#### **2.3.4. Indução de resistência**

As plantas as quais estão expostas ao patógeno possuem a capacidade de ativar mecanismos de defesa no sítio de indução como também em outros locais. Dessa forma, o sucesso para o decréscimo da doença. (ROMEIRO, 1999).

Para Harman et al. (2004), o ácido salicílico, ácido jasmonico e o etileno podem induzir a planta que está sendo atacado por um patógeno, a produzir metabólitos e proteínas que funcionam como barreiras físicas e químicas contra o ataque desses microorganismos.

#### **2.4. Rotação de Culturas**

A rotação de culturas contribui para redução de inóculo de patógenos de áreas com o cultivo de plantas de diferentes famílias botânicas (REIS et al., 2011). Essa diminuição de inóculo de fungos fitopatogênicos se dá pelos mecanismos de supressão do alimento e pelo aumento de microrganismos antagonistas do solo.

Com a rotação de culturas, a fonte de alimento de fitopatógenos, os restos culturais, é suprimida, assim, esse fungo é submetido a condições de inanição. Outro fator importante que ocorre é o aumento da atividade de microrganismos antagonistas do solo e, assim, o patógeno é exposto a condições de competição e, conseqüentemente, condições que propiciem a seleção de fitopatógenos (COOK, 1993; PETERS et al., 2003).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia, da Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados (DBC) com seis repetições, sob o ensaio de germinação carpogênica de *S. sclerotiorum*. Foram realizados 12 tratamentos, em esquema fatorial 6 x 2 (sistemas de produção x tratamento antagonista). Cada parcela foi composta em caixa gerbox de 11 cm x 11 cm x 3 cm, onde foram distribuídos 20 escleródios.

O sistema de produção utilizado caracterizou-se por: soja e pousio, soja e milho, soja e milho com *Brachiaria ruziziensis*, soja e aveia branca e, milho e aveia branca. A cultura da soja foi o cultivo estabelecido na safra agrícola de 2017/2018 para o solo com pousio, milho, milho com *Brachiaria ruziziensis* e aveia branca no inverno de 2018. O quinto tratamento, é definido pelo solo com cultivo de milho na safra agrícola de 2017/2018 com o cultivo de aveia branca no inverno de 2018. O tratamento Ágar-água, foi estabelecido como testemunha. Metade do experimento foi submetido a aplicação do produto Native® e, a outra metade não obteve aplicação de Native®.

#### 3.1. Aquisição e manutenção de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*

O isolado do patógeno *S. sclerotiorum* foram coletados na Fazenda Experimental de Ciências Agrárias (FAECA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). Nessa área ocorre uma infestação natural de escleródios, os quais foram removidos de plantas hospedeiras e, armazenados em refrigerador a 5 °C.

Logo em seguida fez-se a desinfestação superficial destes, através de imersão de hipoclorito de sódio a 2% e após, utilizou-se água estéril, ambos durante 1 minuto e após, plaqueados em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e vertidos para BDA inclinado. Os tubos foram lacrados e armazenados em refrigerador a 5 °C.

### 3.2. Produção de escleródios

Os discos miceliais do patógeno foram repicados em placas de Petri com BDA, após, vedados com filme plástico e incubados por um período de uma semana. Após, o patógeno foi repicado para erlenmeyers já cobertos com discos de cenouras, os quais foram anteriormente autoclavados 120°C/1atm/20'. O patógeno permaneceu incubado a 18 °C em total escuro por 1 mês a fim de formar escleródios (Figura 1).



**Figura 1.** A: Discos de cenouras não autoclavados em erlenmeyers. B: Patógeno repicado para erlenmeyers com discos de cenoura em processo de incubação a 25 °C para formar escleródios.

Para a coleta dos escleródios utilizou-se uma peneira 40 “mesh” e estes foram lavados em água abundante para serem colocados em placas de Petri para serem secos a temperatura ambiente. Os escleródios produzidos foram classificados por tamanho, formando-se três grupos de tamanhos próximos.

Após todos os procedimentos de multiplicação de escleródios, foram realizadas as técnicas de desinfestação dos mesmos, através da solução de hipoclorito de sódio 2% e água esterilizada, cada um durante o período de um minuto, postos para secar em placas de Petri com papel filtro esterilizado. Todo o processo foi realizado em câmara de fluxo laminar, para evitar contaminações.

### 3.3. Coleta de Solos de Sistema de Rotação de Culturas

A coleta de solos de sistema de rotação de culturas foi realizada na Fazenda Experimental de Ciências Agrárias (FAECA) da Universidade Federal da Grande

Dourados (UFGD), Dourados-MS. A FAECA está localizada a latitude de 22° 13' 52" S e, longitude de 54° 59' 10" W com altitude de 411,75 m. O solo da área é classificado como Latossolo Vermelho distroférico, onde são realizados experimentos com rotação de culturas, há mais de 10 anos sob a supervisão do Prof. Dr. Luiz Carlos Ferreira de Souza.

As amostras de solos coletadas no sistema de rotação de culturas, foram relacionados aos tratamentos de pousio, milho, milho com *Brachiaria ruziziensis*, aveia branca e aveia branca referentes ao outono inverno de 2018. As culturas antecessoras do ano agrícola de 2017/2018 correspondia a soja para o tratamento de pousio, milho, milho com *Brachiaria ruziziensis* e aveia branca. A cultura do milho antecedeu ao segundo tratamento de aveia branca. (Quadro 1). Foram realizadas cinco coletas de amostras na camada de 0-10 cm com pá de corte para cada tratamento, as quais foram todas coletadas em Junho de 2018. As cinco amostras de cada tratamento foram misturadas para compor uma amostra composta.

**Quadro 1.** Sistema de Sucessão de Culturas de espécies agrícolas para produção de grãos. Fazenda Experimental de Ciências Agrárias - UFGD - Dourados-MS.

Tratamento	Ano 2015/2016		Ano 2016/2017		Ano 2017/2018	
	Verão	Outono/Inverno	Verão	Outono/Inverno	Verão	Outono/Inverno
T1	Soja	Pousio	Soja	Pousio	Soja	Pousio
T2	Soja	Milho	Soja	Milho	Soja	Milho
		Milho +		Milho +		Milho +
T3	Soja	<i>Brachiaria ruziziensis</i>	Soja	<i>Brachiaria ruziziensis</i>	Soja	<i>Brachiaria ruziziensis</i>
T10	Soja	Aveia Branca	Soja	Aveia Branca	Soja	Aveia Branca
T20	Milho	Aveia Branca	Milho	Aveia Branca	Milho	Aveia Branca

### 3.4. Aquisição de Antagonistas

Utilizou-se o fungicida microbiológico denominado Native®. Esse biocontrolador é composto pelo fungo *Trichoderma harzianum* e pela bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* (AGROFIT, 2018).

A natureza biológica do produto foi comprovada, pelo plaqueamento do produto Native®. Pulverizou-se o biocontrolador em meio de cultura BDA e, este foi incubado



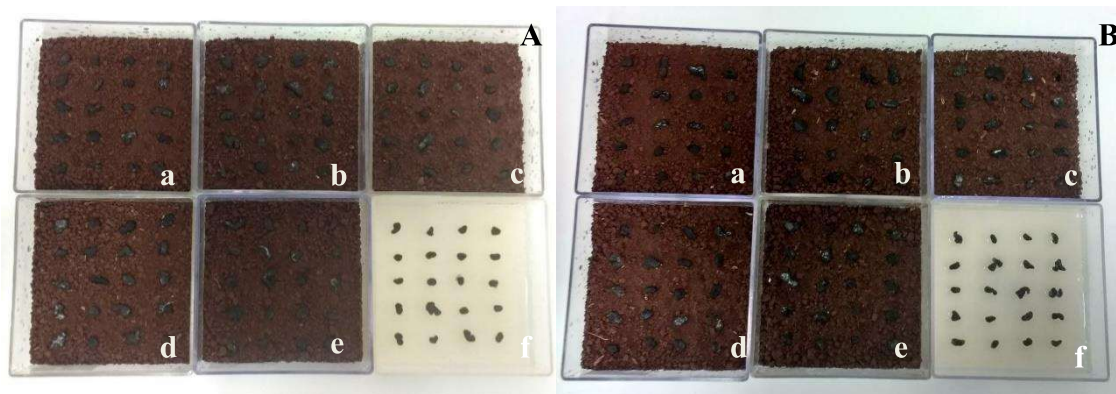
em BOD a 23 °C por 7 dias com fotoperíodo de 12 horas. Após o desenvolvimento fúngico no meio de cultura, foram preparadas lâminas, as quais foram observadas estruturas de *Trichoderma harzianum* em microscópio ótico.

### 3.5. Ágar-água

Um dos tratamentos foi composto de ágar-água, onde o substrato foi esterilizado em autoclave à 120°C/1atm/20'. Foram vertidos uma camada de 1 cm de Ágar-água nos gerboxes correspondentes a esses tratamentos. A concentração correspondia a 1,8%.

### 3.6. Tratamentos

Para os tratamentos estabelecidos e adequadamente identificados, em cada gerbox foi colocado 100mL de amostra composta de cada solo do sistema de rotação de culturas e do ágar-água. Sobre o substrato foram distribuídos 20 escleródios de forma equidistante. Realizou-se a pulverização de 100mg de Native® dissolvido em 1000mL de água destilada, em seis gerboxes de cada tratamento. Assim, foram aplicados 27,77mg.gerbox de Native®. Para a outra metade do experimento, sem a aplicação do produto Native®, foi pulverizado 1L de água destilada, ou seja, 27,77mL de água destilada por gerbox (Figura 2).



**Figura 02.** Tratamentos testados no ensaio: A: Sem aplicação de Native® - a: Soja e Pousio; b: Soja e Milho; c: Soja e Milho com *Brachiaria ruziziensis*; d: Soja e Aveia Branca; e: Milho e Aveia Branca; f: Ágar-água. B: Com aplicação de Native® - a: Soja e Pousio; b: Soja e Milho; c: Soja e Milho com *Brachiaria ruziziensis*; d: Soja e Aveia Branca; e: Milho e Aveia Branca; f: Ágar-água.

A recomendação do fabricante para a aplicação do produto refere-se à dose de 200g/1.000m<sup>2</sup>. Para aplicação de cada gerbox com área de 121 cm<sup>2</sup>, fazia-se necessário a aplicação de 2,42mg de Native® por gerbox, ou 77,44mg para todos os 36 tratamentos, no entanto, optou-se pela aplicação de 0,1g do produto afim de padronizar a aplicação.

### **3.7. Avaliações**

Os gerboxes, para germinação carpogênica dos escleródios, foram mantidos em câmara com temperaturas de 18 °C e fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro. Foram realizadas cinco avaliações, correspondentes aos 33, 40, 47, 54 e 61 dias de incubação dos escleródios.

As avaliações tiveram início quando houve formação de estipes no tratamento testemunha, onde os dados foram obtidos por meio da contagem de estipes e apotécios em cada escleródio. Contabilizou-se o número total de estipes e apotécios para o cálculo do número de estipes por escleródio e de apotécios por escleródio e a percentagem de germinação carpogênica. As avaliações foram findadas através da verificação da estabilidade de germinação dos escleródios.

O programa utilizado para a análise estatística dos dados foi o SANEST. Para os dados referentes à percentagem de germinação fez-se necessário a transformação em arco seno da raiz de (x/100). No que diz respeito aos dados de estipes, estipes por escleródio, apotécios e apotécios por escleródio, os dados foram convertidos em raiz de (x+0,5). Realizou-se a análise de variância e quando houve significância, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% e realizadas análises de regressão para o comportamento das características no tempo de incubação.



A pedido da autora o Capítulo 4 foi retirado do pdf.

## 5. CONCLUSÕES

- Escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* exposto ao solo coletado de áreas no sistema soja e aveia branca apresentam menor germinação carpogênica, porém, quando ocorreu a adição de Native® a germinação foi equivalente aos demais tratamentos;
- Houve interação entre o produto biológico e o efeito dos solos sob diferentes sistemas de rotação/sucessão de culturas na germinação carpogênica e produção de apotécio de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*.

## 6. REFERÊNCIAS IBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**, San Diego, Elsevier – Academic Press, p.827. 2005.
- ALVARENGA, D.O.; QUEIROZ, P.R.; ALMEIDA, A.M.; MELLO, S.C.M. **Aspectos relacionados ao controle biológico do mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 24 p.
- BASTOS, C. N. Possibilidade do controle biológico da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacauzeiro. In: BETTIOL, W. (Org.) **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariuna: EMBRAPA-CNPDA, 1991.
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro. In: **Manual de Fitopatologia – Doenças das plantas cultivadas**, v. 2. KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. São Paulo, Ceres, p. 333-349. 2005.
- BOLAND, G.J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 16, n. 2, p. 93-108, 1994.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, P. H. J. B.; NELSON, B. D. Pathogen profile: *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**. v. 7, n. 1, p. 1–16, 2006.
- CANTERI, M.G.; DALLA PRIA, M.; SILVA, O.C. **Principais doenças fúngicas do feijoeiro**: orientações para manejo econômico e ecológico. Ponta Grossa: UEPG, 1999. 178 p.
- CASSETARI NETO, D.; MACHADO, A.Q.; SILVA, R.A. **Manual de doenças da soja**. São Paulo: Cheminova Brasil LTDA, 2010. 57 p.
- CHAVES, G.M. Estudo sobre *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Experientiae**, Viçosa, v. 4, n. 2, p. 69-133, 1964.
- COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. The American Phytopathological Society, St. Paul, p. 539, 1993.
- DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of soil fungi**. CRC Press, London, p. 630, 1980.
- ETHUR, L. Z. **Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de Fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro**. Universidade Federal de Santa Maria (Tese). Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Santa Maria, RS, 2006.

FELLER, L. A. **Manejo da palhada de cereais de inverno no controle de mofo branco da soja**. Universidade Estadual do Centro-Oeste (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Guarapuava, PR, 2014.

GIESE, E. C.; BARBOSA, A. M.; SILVA, M. L. C. **Glucanases fúngicas: Produção e aplicações das  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6 glucanases**. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio30/glucanases.asp>> Acesso: 08 jul. 2008.

HARMAN, G. E. et al., *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews, Microbiology*, Washington, v. 2, 2004.

MASSOLA JÚNIOR, N.S.; KRUGNER, T.L. Fungos fitopatogênicos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, São Paulo, 2011. v. 1, cap. 8, p. 149-206.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariuna: Embrapa-DNPMA, p. 393-419, 1998.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – **Consulta de Produtos Formulados**. <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)> Acesso: 08 de Dezembro de 2018.

PAULA JÚNIOR, T.J.; VIEIRA, R.F.; LOBO JÚNIOR, M.; MORANDI, M.A.B.; ARNEIRO, J.E.S. Mofo branco. In: PRIA, M.D.; SILVA, O.C. **Cultura do feijão: doenças e controle**. Ponta Grossa: Editora UEPG, 2010. cap. 6 e 7.

PETERS, R.D.; STURZ, A.V.; CARTER, M.R.; Sanderson, J.B. Developing disease-suppressive soils through crop rotation and tillage management practices. **Soil & Tillage Research**, Maryland Heights, v.72, p. 181-192, 2003.

REIS, E.M.; CASA, R.T.; BIANCHIN, V. Controle de doenças de plantas pela rotação de culturas. **Summa Phytopathologica.**, Botucatu, v. 37, n. 3, p. 85-91, 2011.

ROMEIRO, R. S. Indução de resistência em plantas a patógenos. Vicososa: Ed. UFV, 45p. **Caderno Didático** n° 56, 1999.

SAMUEL, G. J. *Trichoderma*: A review of biology and systematics of the genus. **Journal of Mycology**, Columbus, v. 100, p. 923-935, 1996.

SILVA, F. P. M. **Germinação carpopôgica de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary sob diferentes extratos e resíduos de vegetais**. Universidade Federal da Grande Dourados (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Dourados, MS, 2007.

SILVA, F.P.M.; GAVASSONI, W.L.; BACCHI, L.M.A., GARCEZ, F.R. Germinação carpopôgica de *Sclerotinia sclerotiorum* sob diferentes resíduos e extratos de plantas cultivadas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 37, n. 3, p. 131-136, 2011.

STEADMAN, J. R. Control of plant diseases caused by *Sclerotinia* species.  
**Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 8, p. 904-907, 1979.