AMANDA FERREIRA BONTEMPO

SELEÇÃO “IN VITRO” DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. E *Bacillus* spp. EM BAIXA TEMPERATURA DE CRESCIMENTO PARA O CONTROLE DE *Sclerotium cepivorum*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa - *Campus* Rio Paranaíba como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

RIO PARANAÍBA - MINAS GERAIS

2016

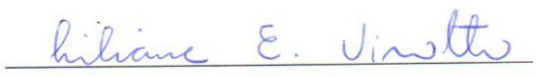
AMANDA FERREIRA BONTEMPO

SELEÇÃO “IN VITRO” DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. E *Bacillus* spp. EM BAIXA TEMPERATURA DE CRESCIMENTO PARA O CONTROLE DE *Sclerotium cepivorum*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa - *Campus* Rio Paranaíba como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Aprovada: 26 de fevereiro de 2016

Prof. Pedro Ivo Vieira Good God
(Presidente da Banca)



Prof. Liliane Evangelista Visôtto
(Co-orientadora)

Carine Rezende Cardoso

A Deus,

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Laboratório de BioControle Farroupilha pela cessão dos isolados para realização deste trabalho.

À Cooperativa Agropecuária do Alto Paranaíba (COOPADAP) pela cessão da área de campo e ajuda na condução do experimento

À Associação Nacional dos Produtores de Alho (ANAPA) pelo apoio aos projetos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa envolvendo podridão-branca.

ÍNDICE

RESUMO v

ABSTRACT vii

INTRODUÇÃO GERAL 1

LITERATURA CITADA 3

SELEÇÃO "IN VITRO" DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. E *Bacillus* spp. EM BAIXA TEMPERATURA DE CRESCIMENTO PARA O CONTROLE DE *Sclerotium cepivorum*

INTRODUÇÃO 5

MATERIAL E MÉTODOS 6

Crescimento de *Trichoderma* spp. a 11 ºC 6

Antagonismo de *Trichoderma* spp. a *Sclerotium cepivorum* 'in vitro' 7

Antagonismo de *Bacillus* a *Sclerotium cepivorum* 'in vitro' 8

Aplicação de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. para o manejo da podridão-branca em incubadora, casa de vegetação e em campo 9

Procedimentos gerais 9

Experimentos em incubadora 10

Experimentos em casa de vegetação 10

Experimento em campo 11

RESULTADOS 12

Crescimento de *Trichoderma* spp. a 11 ºC 12

Antagonismo de *Trichoderma* spp. a *Sclerotium cepivorum* 'in vitro' 13

Antagonismo de *Bacillus* spp. a *Sclerotium cepivorum* 'in vitro' 14

Aplicação de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. para o manejo da podridão-branca em incubadora, casa de vegetação e em campo 15

DISCUSSÃO 16

CONCLUSÕES GERAIS 19

LITERATURA CITADA 20

RESUMO

BONTEMPO, Amanda Ferreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2016. **Seleção "in vitro" de isolados de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. em baixa temperatura de crescimento para o controle de *Sclerotium cepivorum***. Orientador: Everaldo Antônio Lopes. Co-orientadores: Pedro Ivo Vieira Good God e Liliane Evangelista Visôtto.

A podridão-branca, causada pelo fungo *Sclerotium cepivorum*, é uma das principais ameaças ao cultivo de plantas do gênero *Allium*. A aplicação de agentes de biocontrole pode contribuir para o manejo da doença, como espécies dos gêneros *Trichoderma* e *Bacillus*, que são inimigos naturais de *S. cepivorum*. A maioria dos isolados desses antagonistas cresce em temperaturas de 25 a 30 ºC, entretanto, alho e cebola são cultivados durante estações frias no Brasil (outono-inverno) e a germinação do escleródio ocorre entre 13 e 18 ºC. Assim, a seleção de agentes de biocontrole deve visar isolados que crescem e inibem *S. cepivorum* sob temperaturas abaixo de 18 ºC. O presente trabalho objetivou selecionar isolados de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. capazes de crescer e inibir a germinação de escleródios de *S. cepivorum* a 16 ºC e avaliar o efeito dos isolados mais promissores no controle da doença em cebolinha em cultivo em incubadora e cebola cultivada em casa de vegetação e em campo. Doze dos 44 isolados de *Trichoderma* foram selecionados devido à habilidade de crescerem a 11 ºC. Dentre eles, os isolados GF420, GF424 e GF426 reduziram em mais de 80 % a germinação de escleródios e colonizaram mais de 70 % dos escleródios em ambos os experimentos 'in vitro' a 16 ºC. Todos os isolados de *Bacillus* spp. (GF33, GF63, GF203, GF266 e GF340) reduziram a germinação de escleródios em mais de 80 %. Os isolados GF 203 e GF266 de *Bacillus* e GF420, GF424 e GF426 de *Trichoderma* foram avaliados em experimentos em incubadora do tipo BOD, casa de vegetação e campo visando ao controle de *S. cepivorum* em cebolinha e cebola. Para os experimentos em incubadora, o solo foi artificialmente infestado com cinco escleródios por 100 cm^3 de solo. Um campo localizado em Rio Paranaíba – Minas Gerais, naturalmente infestado com sete escleródios por 100 cm^3 de solo, foi usado como área experimental e fonte de solo para os experimentos em casa de vegetação. Houve incidência de podridão-branca apenas em poucas plantas nos experimentos de laboratório aos 63 dias de cultivo, e a doença não ocorreu em casa de vegetação e campo ao final de 140 dias. Assim, não foi possível avaliar o real potencial dos isolados no controle do patógeno na presença de hospedeiro suscetível. Os isolados GF420, GF424 e GF426 de *Trichoderma* spp. e GF33, GF63, GF203, GF266 e GF340 de *Bacillus* spp. colonizam e reduzem a germinação de escleródios de *S. cepivorum* a 16 ºC. Experimentos adicionais

em casa de vegetação e campo são necessários para selecionar pelo menos um isolado para o manejo da podridão-branca.

ABSTRACT

BONTEMPO, Amanda Ferreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2016. "**In vitro" screening of *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. isolates under low temperature conditions for the control of *Sclerotium cepivorum***. Adviser: Everaldo Antônio Lopes. Co-advisers: Pedro Ivo Vieira Good God and Liliane Evangelista Visôtto.

White rot, caused by the fungus *Sclerotium cepivorum*, is a major threat of *Allium* spp. The application of biocontrol agents can enhance the management of the disease. *Trichoderma* and *Bacillus* are natural enemies of *S. cepivorum*. The majority of the isolates of these antagonists grows at temperature from 25 to 30 ºC. However, garlic and onion are cultivated during the cold seasons in Brazil (autumn-winter) and sclerotia germination of *S. cepivorum* occurs between 13 to 18 ºC. Thus, the screening of biocontrol agents should target isolates which grow and inhibit *S. cepivorum* under temperatures below 18 ºC. Therefore, the present work aimed to screen isolates of *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. able to grow and inhibit sclerotia germination of *S. cepivorum* at 16 ºC, and to assess the effect of the most promising isolates on the control of the disease in Japanese bunching onion grown in incubator and onion cultivated in greenhouse and field. Twelve out of 44 isolates of *Trichoderma* were selected due to the ability of growth at 11 ºC. Among them, the isolates GF420, GF424 and GF426 reduced by more than 80 % the germination of sclerotia and colonized by more than 70 % the sclerotia in both of the in vitro experiments at 16 ºC. All isolates of *Bacillus* spp. (GF33, GF63, GF203, GF266 and GF340) reduced the germination of sclerotia by more than 80 %. The isolates GF 203 and GF266 of *Bacillus* and GF420, GF424 and GF426 of *Trichoderma* were assessed in experiments carried out in incubator, greenhouse and field aiming the control of *S. cepivorum* in Japanese bunching onion and onion. For the experiments in incubator, the soil was artificially infested with five sclerotia/100 cm^3 of soil. A field located in Rio Paranaíba – Minas Gerais, naturally infested with seven viable sclerotia/100 cm^3 of soil, was used as experimental area and source of soil for experiments in greenhouse. There was incidence of white rot only in few plants in the incubator experiment at 63 days and the disease did not occur in both the greenhouse and field experiments at 140 days. Thus, it was not possible to assess the real potential of the isolates for the control of the pathogen in the presence of susceptible host. The isolates GF420, GF424 and GF426 of *Trichoderma* spp. and GF33, GF63, GF203, GF266 and GF340 of *Bacillus* spp. colonise and reduce the germination of sclerotia of *S. cepivorum* at 16 ºC. Further greenhouse and field experiments are required to select at least one isolate for the

greenhouse and field experiments are required to select at least one isolate for the management of the white rot.

INTRODUÇÃO GERAL

A cebola (*Allium cepa* L.) e o alho (*Allium sativum* L.) são hortaliças cultivadas em todo o Brasil, com exceção de Roraima, Amapá e Acre (IBGE, 2012). A produtividade dessas culturas pode ser prejudicada por inúmeros fatores abióticos e bióticos. Temperaturas elevadas durante a época de cultivo, excesso ou déficit de água e desequilíbrio nutricional são os principais componentes abióticos que limitam o desenvolvimento das plantas. Por sua vez, vários patógenos parasitam o alho e a cebola, reduzindo a produção de bulbos e, em alguns casos, levando as plantas à morte. Em todo o mundo, o fungo *Sclerotium cepivorum* é o agente causal da podridão-branca, responsável por perdas de até 100 % em lavouras doentes (PINTO *et al*., 1998; NUNES & KIMATI, 2004). Na região do Alto Paranaíba, Minas Gerais, por exemplo, o fungo encontra-se disperso em várias propriedades produtoras de alho e cebola, resultando em prejuízos e abandonos de áreas infestadas.

O fungo infecta apenas plantas do gênero *Allium*, a exemplo do alho, cebola, cebolinha (*A. schoenoprasum* L.), alho-poró (*A. porrum* L.). Embora tenha limitada gama de hospedeiros, a rotação de culturas não é uma estratégia eficiente no manejo dessa doença, uma vez que o fungo pode sobreviver por até 20 anos no solo, devido a produção de estruturas de resistência, chamadas de escleródios, os quais são pequenos, esféricos e de coloração escura (SCHWARTZ & MOHAN, 2008).

A germinação dos escleródios é estimulada por compostos a base de enxofre presentes nos exsudatos radiculares das plantas do gênero *Allium* e em condições de solo úmido e temperatura entre 13 e 18 °C (COLEY *et al*., 1990). Após a germinação, o fungo produz tufo micelial, que cresce até 2 cm no solo para infectar raízes de plantas suscetíveis (FUGA *et al*., 2012). As hifas penetram na epiderme da raiz por meio de apressórios. Em seguida, ocorre a penetração pela hipoderme, seguida pelo crescimento no córtex das raízes. Células penetradas pelas hifas são mortas e a produção de enzimas e ácidos pelo patógeno contribui para o apodrecimento dos tecidos infectados e o desenvolvimento de sintomas da doença (FUGA *et al*., 2012).

Sinais do ataque do fungo são visíveis a olho nu, como amarelecimento, ‘dieback’, morte das folhas e podridão mole dos bulbos, que podem resultar em morte do hospedeiro. Os bulbos e a base das plantas infectadas são recobertos por micélio esbranquiçado, progredindo para a produção de massas de pequenos escleródios (NUNES & KIMATI, 2004). Milhares de escleródios são produzidos em cada planta e essas estruturas de resistência permanecem no solo após a morte da planta. Com isso, o

patógeno sobrevive na área infestada por muitos anos.

A dispersão do patógeno ocorre principalmente devido a materiais de plantio infectados e pelo transporte de solo infestado, aderido em implementos, animais e escorrimento superficial de solo pela água. Assim, como a maioria dos patógenos formadores de escleródio e que são habitantes do solo, as medidas de controle são geralmente pouco eficientes em reduzir a população de *S. cepivorum* quando aplicadas isoladamente.

O manejo da podridão-branca deve integrar diferentes métodos de controle, como, por exemplo, o uso de fungicidas, solarização do solo, biofumigação, antecipação da época de plantio e aplicação de indutores de germinação (PINTO *et al*., 2000; METCALF *et al*., 2004; FUGA *et al*., 2012; VILLALTA *et al*., 2012). A rotação de culturas e o uso de cultivares resistentes não se aplicam ao manejo da doença, devido à sobrevivência prolongada do fungo no solo e a ausência de genótipos resistentes (METCALF *et al*., 2004; FUGA *et al*., 2012). A eficiência dos fungicidas no controle da doença é limitada, em razão da resistência dos escleródios à ação de alguns produtos, a degradação de compostos ativos pela microbiota do solo e da dificuldade em atingir o alvo (VILLALTA *et al*., 2012). Além disso, poucos produtos estão disponíveis no mercado mundial para o uso dos produtores. Assim, a busca por estratégias para adoção em programas de manejo sustentável da podridão-branca inclui a seleção de agentes de controle biológico adaptados às condições edafoclimáticas de dada região de cultivo de *Allium* spp.

Fungos do gênero *Trichoderma* e bactérias do gênero *Bacillus* são exemplos de microrganismos usados no manejo da podridão-branca (McLEAN & STEWART, 2000; MELERO-VARA *et al*., 2000; McLEAN *et al*., 2001; CLARKSON *et al*., 2004; AVILA-MIRANDA *et al*., 2006; STEWART & McLEAN, 2007; VILLALTA *et al*., 2012). Agem sobre *S. cepivorum* por meio de antibiose e também por hiperparasitismo, no caso de espécies de *Trichoderma*. Além do potencial na redução da população de *S. cepivorum* no solo, esses antagonistas possuem a vantagem de serem facilmente produzidos em massa em fermentadores industriais. Assim, a seleção de isolados de *Trichoderma* e *Bacillus* pode resultar em bioprodutos que poderão ser usados no manejo integrado da podridão-branca. Diante do exposto, avaliamos neste trabalho a capacidade de isolados de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. em controlar *S. cepivorum* em laboratório, casa de vegetação e em campo.

LITERATURA CITADA

AVILA-MIRANDA, M. E.; HERRERA-ESTRELL, A.; PEÑA CABRIALES, J. J. Colonization of the rhizosphere, rhizoplane and endorhiza of garlic (*Allium sativum* L.) by strains of *Trichoderma harzianum* and their capacity to control *Allium* white-rot under field conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 1823-1830, 2006.

CLARKSON, J. P.; MEAD, A.; PAYNE, T.; WHIPPS, J. M. Effect of environmental factors and *Sclerotium cepivorum* isolate on sclerotial degradation and biological control of white rot by *Trichoderma*. **Plant Pathology**, v. 53, p. 353-362, 2004.

COLEY, J. R.; MITCHEL, C. M.; SANSFORD, E. C. Long-term survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and *Stromatinia gladioli*. **Plant Pathology**, v. 39, p. 58-69, 1990.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário 2006 - Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação: Segunda Apuração. Rio de Janeiro: IBGE, 2012. 758 p. Disponível em: http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv61914.pdf. Acesso em: 17 de janeiro de 2016.

FUGA, C. A. G.; LOPES, E. A.; VIEIRA, B. S. Etiologia, epidemiologia e controle de doenças causadas por *Sclerotium rolfsii* e *S. cepivorum*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 20, p. 278-322, 2012.

McLEAN, K. L.; STEWART, A. Application strategies for control of onion white rot by fungal antagonists. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 28, p. 115-122, 2000.

McLEAN, K. L.; SWAMINATHAN, J.; STEWART, A. Increasing soil temperature to reduce sclerotial viability of *Sclerotium cepivorum* in New Zealand soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, p. 137-143, 2001.

MELERO-VARA, J. M.; PRADOS-LIGERO, A. M.; BASALLOTE-UREBA, M. J. Comparison of physical, chemical and biological methods of controlling garlic white rot. **European Journal of Plant Pathology**, v. 106, p. 581-588, 2000.

METCALF, D. A.; DENNIS J. J. C.; WILSON, C. R. Effect of inoculum density of *Sclerotium cepivorum* on the ability of *Trichoderma koningii* to suppress white rot of onion. **Plant Disease**, v. 88, p. 287-291, 2004.

NUNES, M. E. T.; KIMATI, H. Doenças do alho e cebola. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.).

Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas. 4 ed. Piracicaba: Ceres, p. 49-64, 2004.

PINTO, C. M. F.; MAFFIA, L. A.; BERGER, R. D.; MIZUBUTI, E. S. G.; CASALI, V. W. D. Progress of white rot on garlic cultivars planted at different times. **Plant Disease**, v. 82, p.1142-1146, 1998.

PINTO, C. M. F.; MAFFIA, L. A.; CASALI, V. W. D.; BERGER, R. D.; CARDOSO, A. A. Production components and yield loss of garlic cultivars planted at different times in a field naturally infested with *Sclerotium cepivorum*. **International Journal of Pest Management**, v. 46, p. 67-72, 2000.

SCHWARTZ, H. F.; MOHAM, S. **Compendium of onion and garlic disease**. American Phytophatological Society (APS). St Paul, Minnesota, p. 127, 2008.

STEWART, A.; McLEAN, K. L. Biological control of onion white rot. In: CHINCHOLKAR, S. B.; MUKERJI, K. G. (Ed.). **Biological control of plant diseases**. New York: The Haworth Press, Inc. p. 123-149, 2007.

VILLALTA, O. N.; WITE, D.; PORTER, I. J.; MCLEAN, K. L.; STEWART, A.; HUNT, J. Integrated control of onion white rot on spring onions using diallyl disulphide, fungicides and biocontrols. **Acta Horticulturae**, v. 944, p. 63-71, 2012.

SELEÇÃO "IN VITRO" DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. E *Bacillus* spp. EM BAIXA TEMPERATURA DE CRESCIMENTO PARA O CONTROLE DE *Sclerotium cepivorum*

INTRODUÇÃO

A podridão-branca, causada pelo fungo *Sclerotium cepivorum*, é uma das principais doenças de plantas do gênero *Allium*. Por se tratar de um patógeno habitante de solo e que sobrevive por até duas décadas no solo na forma de escleródios (COLEY-SMITH *et al*., 1990), a integração entre diferentes estratégias de manejo deve ser adotada visando a redução populacional do fungo. A aplicação de agentes de controle biológico é uma das principais medidas de manejo da doença, juntamente com a solarização do solo, a biofumigação, o controle químico e o uso de indutores de germinação (FUGA *et al*., 2012; VILLALTA *et al*., 2012).

Espécies de *Trichoderma* e *Bacillus* são os principais antagonistas usados no manejo de *S. cepivorum* em escala global (McLEAN & STEWART, 2000; MELERO-VARA *et al*., 2000; McLEAN *et al*., 2001; CLARKSON *et al*., 2004; AVILA-MIRANDA *et al*., 2006; STEWART & McLEAN, 2007; VILLALTA *et al*., 2012). O fungo *Trichoderma* controla *S. cepivorum* por meio de hiperparasitismo e antibiose. Diferentes espécies do antagonista já foram avaliadas no tratamento de sementes ou aplicação direta no solo, como, por exemplo, *Trichoderma atroviride*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii*, *T. virens* (McLEAN & STEWART, 2000; CLARKSON *et al*., 2004; AVILA-MIRANDA *et al*., 2006). Por sua vez, bactérias do gênero *Bacillus*, principalmente *B. subtilis*, produzem compostos tóxicos a *S. cepivorum* e outros fungos de solo, tais como bacitracina, polimixina e gramicidina (WONG & HUGLES, 1986; CRUZ *et al*., 2006; EARL *et al*., 2008; LI *et al*., 2009; DOORNBOS *et al*., 2012). Em alguns casos, a eficiência do tratamento com *Trichoderma* ou *Bacillus* é similar ou maior do que os fungicidas procimidone, iprodione e vinclozolin (UTKHEDE & RAHE, 1980; McLEAN & STEWART, 2000).

No entanto, a aplicação de agentes de controle biológico pode não reduzir a população de *S. cepivorum* no solo (MELERO-VARA *et al*., 2000), mesmo quando a densidade de inóculo não é alta, ou seja, inferior a 180 escleródios/kg de solo (MERRIMAN *et al*., 1984). Métodos inadequados de aplicação dos antagonistas, incompatibilidade dos organismos com agrotóxicos e fertilizantes e a falta de adaptação dos isolados às condições de solo prevalentes durante o cultivo das plantas suscetíveis podem limitar a chance de sucesso no manejo biológico da doença (McLEAN *et al*.,

2001; CLARKSON *et al*., 2002; STEWART & McLEAN, 2007). Isolados não adaptados às condições do solo dificilmente se estabelecerão no ambiente e tampouco controlarão o alvo. A forma de aplicação e a compatibilidade dos antagonistas devem ser avaliadas após etapas de seleção em condições controladas ou mesmo em campo e podem ser ajustadas para favorecer a ação do antagonista.

A maioria dos isolados de *Trichoderma* e *Bacillus* cresce em temperaturas de 25-30 ºC (PALOP *et al*., 1999; EARL *et al*., 2008; MUKHERJEE *et al*., 2013; SINGH *et al*., 2014). Considerando que o alho e a cebola são cultivados nos períodos mais frios no Brasil e que a germinação de escleródios de *S. cepivorum* ocorre entre 13 e 18 ºC (COLEY-SMITH *et al*., 1990), foram selecionados neste trabalho isolados de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. capazes de crescer a 11 ºC e avaliou-se o potencial de dois isolados bacterianos e três fúngicos no controle de *S. cepivorum* em cebolinha em cultivo em incubadora e cebola cultivada em casa de vegetação e em campo.

MATERIAL E MÉTODOS

Crescimento de *Trichoderma* spp. a 11 ºC

Quarenta e quatro isolados de *Trichoderma* spp. (GF56, GF357, GF66, GF422-1, GF424, GF421, GF426, GF420, GF417-1, GF425-1, GF419-1, GF423, GF418, GF427-1, GF417-2, GF39, GF354, GF441, GF126, GF327, GF428, GF419-2, GF44, GF53, GF121, GF332, GF25, GF60, GF427-2, GF221, GF425-2, GF371, GF79, GF422-2, GF75, GF45, GF116, GF119, GF440, GF337, GF03, GF04, GF361, GF426-2) foram incluídos no estudo. Os isolados pertencem ao Laboratório de Biocontrole Farroupilha (Grupo Farroupilha, Patos de Minas – MG).

Para avaliar o crescimento de *Trichoderma* a 11 ºC, discos de micélio de 2,56 cm^2 foram retirados de colônias após cultivo em meio batata-dextrose-ágar (BDA) a 25 ºC por sete dias. Em seguida, foram depositados no centro de placas de Petri de 26,78 cm^2 (9 cm de diâmetro), contendo BDA. Os 44 isolados foram avaliados em dois experimentos. No primeiro 28 isolados (GF56, GF357, GF66, GF422-1, GF424, GF421, GF426, GF420, GF417-1, GF425-1, GF419-1, GF423, GF418, GF427-1, GF417-2, GF39, GF354, GF441, GF126, GF327, GF428, GF419-2, GF44, GF53, GF121, GF332, GF25, GF60) foram avaliados, enquanto que os 16 isolados restantes (GF427-2, GF221, GF425-2, GF371, GF79, GF422-2, GF75, GF45, GF116, GF119, GF440, GF337, GF03, GF04, GF361, GF426-2) foram avaliados no segundo experimento. As placas foram mantidas em BOD a 11 ºC, e avaliadas de dois em dois dias, por meio de fotos tiradas com câmera digital (Samsung ES68) a aproximadamente 10 cm de altura das

placas. Os experimentos finalizaram quando o primeiro isolado ocupou toda a placa. A área da colônia foi mensurada a partir das imagens digitalizadas com uso de software Image Tool 3.0 (UTHSCSA, 2014).

A avaliação visual da densidade do micélio e da presença de esporos (coloração esverdeada) dos isolados de *Trichoderma* spp. cultivados a 11 ºC foi realizada aos 15 dias após o início dos experimentos. Para avaliação da densidade do micélio, observou-se somente se havia alta ou baixa produção de hifas, já para a avaliação da presença de esporos, notou-se a presença de coloração esverdeada sobre a colônia.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições, considerando-se cada placa como unidade experimental. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA, Teste F a 5 % de probabilidade) e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade.

Antagonismo de *Trichoderma* spp. a *Sclerotium cepivorum* 'in vitro'

Escleródios de *S. cepivorum* foram produzidos após cultivo em BDA por 15 dias a 16 ºC. Em seguida, foram desinfestados superficialmente com solução de hipoclorito de sódio 1 % (v:v) por 3 a 5 min, seguido de imersão em água destilada esterilizada por duas vezes, para remoção do excesso de hipoclorito de sódio. Dez escleródios foram colocados em cada placa de Petri de 9 cm de diâmetro contendo 60 g de areia autoclavada (120 ºC por 2 h) e umedecida com 10 mL de água destilada autoclavada. Em seguida, foram aplicados 5 mL de suspensão de conídios de *Trichoderma* ($1x10^7$ conídios.mL^{-1}) sobre os escleródios com auxílio de pipeta graduada. A calibração da suspensão de inóculo foi realizada com auxílio de câmara de Neubauer. Todos esses procedimentos foram realizados em condições assépticas, no interior de câmara de fluxo laminar. As placas foram mantidas em BOD a 11 ºC. Após 10 dias, os escleródios foram novamente submetidos à desinfestação superficial, e colocados em placa de Petri contendo meio BDA. As placas novamente foram mantidas em BOD a 11 ºC por sete dias, quando foram avaliadas visualmente quanto à germinação do escleródio e o crescimento micelial de *Trichoderma*. A identificação do fungo foi realizada pelo preparo de lâminas temporárias a partir do talo produzido sobre os escleródios e observação em microscópio óptico.

O experimento foi conduzido duas vezes em delineamento inteiramente

casualizado (DIC) com seis repetições, considerando-se cada placa como uma unidade experimental. Os dados dos experimentos foram analisados separadamente, em razão da interação entre as épocas dos experimentos e os isolados. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA, Teste F a 5 % de probabilidade) e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Antagonismo de *Bacillus* a *Sclerotium cepivorum* 'in vitro'

Cinco isolados de *Bacillus* spp. (GF33, GF63, GF203, GF 266 e GF340) foram avaliados neste experimento quanto à sua capacidade de inibir a germinação de escleródios de *S. cepivorum*. Os antagonistas também foram cedidos pelo Laboratório de Biocontrole Farroupilha (Grupo Farroupilha, Patos de Minas – MG).

Os isolados bacterianos foram cultivados em placas de Petri contendo meio Extrato de Malte (EM) a 28 ºC por 5 dias. Solução salina (0,85 % de NaCl) foi adicionada em cada placa ao final do período de incubação e as células bacterianas foram removidas com auxílio de alça de Drigalski e recolhidas em béquer. A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada para densidade óptica a 540 nm igual a 0,2 com uso de espectrofotômetro.

Escleródios de *S. cepivorum* foram produzidos após cultivo em BDA por 15 dias a 16 ºC. Em seguida, foram desinfestados superficialmente com solução de hipoclorito de sódio 1 % (v:v) por 3 a 5 min, seguido de imersão em água destilada esterilizada por duas vezes, para remoção do excesso de hipoclorito de sódio. Em seguida, dez escleródios ficaram imersos em suspensão bacteriana por 1 h. Os escleródios foram recolhidos e plaqueados em meio BDA e mantidos em incubadora a 25 ºC por 15 ou 20 dias. No 15º dia, cinco escleródios foram recolhidos, desinfestados superficialmente, colocados em BDA e incubados a 16 ºC por sete dias. No 20º dia, os cinco escleródios restantes foram recolhidos, seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente. Após o período de incubação, o número de escleródios germinados e, ou colonizados por bactérias foi avaliado sob microscópio estereoscópico. Em seguida, as placas foram mantidas novamente em incubadora por sete dias, mas com temperatura de 28 ºC. Após esse período, o número de escleródios colonizados por bactérias foi avaliado. Essa etapa adicional objetivou incubar os escleródios em temperatura mais favorável ao crescimento bacteriano, facilitando assim o crescimento rápido de eventuais isolados que tinham desenvolvimento mais lento a 25 ºC.

O experimento foi conduzido duas vezes em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com seis repetições, considerando-se cada placa como uma unidade experimental. Os dados dos experimentos foram analisados em conjunto, em razão da ausência de interação entre as épocas dos experimentos e os isolados. Os números de escleródios germinados e, ou colonizados por bactérias foram convertidos para valores percentuais e, em seguida, foram submetidos à análise de variância (ANOVA, Teste F a 5 % de probabilidade) e comparação de médias pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Aplicação de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* para o manejo da podridão-branca em incubadora, casa de vegetação e em campo

Procedimentos gerais

Para os experimentos em incubadora, o solo foi artificialmente infestado com cinco escleródios por 100 cm^3 de solo. O solo usado para os experimentos em casa de vegetação foi coletado em uma área naturalmente infestada com *S. cepivorum* na Fazenda COOPADAP, no município de Rio Paranaíba – MG (19º 20. 411' S de latitude e 46º 08. 326' W de longitude). O experimento de campo foi implantado no mesmo local.

A densidade de escleródios no solo para os experimentos foi determinada seguindo adaptação dos métodos de Papavizas (1972), Crowe *et al*. (1980) e Vimard *et al*. (1986). Para isso, amostras de 100 cm^3 de solo foram dissolvidas em 1L de água e homogeneizadas em liquidificador, em baixa rotação por 30 segundos, e depois passadas através de peneira de 20 mesh acoplada a uma de 60 mesh. Todo o material retido no liquidificador e na peneira de 20 mesh foi lavado novamente, até restar apenas resíduos maiores que os escleródios. O material retido na peneira de 20 mesh foi descartado e os resíduos da peneira de 60 mesh foram recolhidos com auxílio de piseta em béquer de 500 mL, seguido da adição de 300 mL de solução de sacarose 2,5 M. O béquer contendo a solução com o material foi submetido a agitação por 1 minuto, com posterior período de repouso por 20 segundos. Os resíduos decantados foram descartados e o sobrenadante contendo os escleródios foi vertido na peneira de 60 mesh para retirada do excesso de sacarose. Posteriormente, o material retido na peneira foi recolhido em papel filtro e colocado para secar em temperatura ambiente por 24 horas. Após este período, o número total de escleródios (de coloração preta sem brilho, geralmente esféricos e firmes) foi quantificado sob microscópio estereoscópio.

Cebolinha cultivar Cristobal foi usada nos experimentos em laboratório e cebola cultivar Perfecta foi usada nos experimentos de casa de vegetação e de campo. Dois isolados de *Bacillus* sp. (GF 203 e GF 266, na dose de 4 L ha^{-1}) e três isolados de *Trichoderma* spp. (GF 420, GF 424 e GF 426, na dose de 500 g ha^{-1}) foram formulados em grânulos dispersíveis em água (WG) pelo Laboratório de Biocontrole Farroupilha usando protocolo próprio e foram usados nos experimentos. A concentração final de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* foi, respectivamente, $1x10^9$ unidades formadoras de colônias por grama (UFC.g^{-1}) e $3x10^9$ unidades formadoras de colônia por mililitros (UFC.mL^{-1}). O fungicida triadimenol (Bayfidan EC, 250 g do ingrediente ativo por L) e uma testemunha não tratada foram incluídos como tratamentos controles.

Experimentos em incubadora

Dois experimentos foram conduzidos em incubadora do tipo BOD entre os dias 03 de março a 04 de maio de 2016. Solo autoclavado foi artificialmente infestado com cinco escleródios por 100 cm^3 de solo e foi usado para preencher copos plásticos de 500 mL. Em seguida, foi transplantada uma plântula de cebolinha por copo. Os tratamentos foram aplicados com auxílio de pipeta graduada, na superfície do solo logo após o transplantio, aos 30 e 60 dias após o transplantio.

Os copos foram mantidos em BOD com temperatura de 16 ºC e fotoperíodo de 12 h de luz. As plantas foram irrigadas diariamente e adubadas quinzenalmente com solução nutritiva contendo NPK 13-13-15 (Nutriverde®). A contagem de eventuais plantas doentes ocorreu a cada sete dias, com descrição dos sintomas observados. A altura das plantas foi mensurada ao final do experimento, aos 63 dias após o transplantio.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com sete repetições, considerando-se cada copo como unidade experimental. Os valores de altura de planta foram submetidos à análise de variância (ANOVA, Teste F a 5 % de probabilidade) e comparação de médias pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Experimentos em casa de vegetação

Dois experimentos foram conduzidos em casa de vegetação localizada na área experimental da UFV - Campus de Rio Paranaíba entre os dias 28 de julho a 15 de dezembro de 2015. O solo infestado foi coletado no campo, homogeneizado em

betoneira e, em seguida, foi retirada uma amostra de 500 g, para quantificação da densidade de inóculo. Sete escleródios viáveis, em média, foram encontrados por 100 cm^3 de solo.

Vasos plásticos de 3 L de capacidade foram preenchidos com solo e, em seguida, foram semeadas cinco sementes por vaso. Os produtos biológicos e o fungicida foram aplicados na superfície do solo logo após o semeio, e novamente aos 30, 60 e 75 dias após o semeio com o auxílio de pipeta graduada.

As plantas foram irrigadas diariamente, durante 140 dias e adubadas com Nutriverde (NPK 13-13-15) quinzenalmente. O delineamento experimental adotado foi inteiramente ao acaso com seis repetições, considerando-se cada vaso como unidade experimental. As médias das temperaturas máxima, média e mínima, foram 42 ºC, 32 ºC e 22 ºC, respectivamente.

Experimento em campo

O experimento foi conduzido entre os dias 25 de junho a 14 de novembro de 2015. O preparo de solo (gradagem, encanteiramento, correção de acidez e fertilidade), irrigação e manejo fitossanitário (exceto medidas de controle da podridão-branca) foram realizados conforme o recomendado para a cultura da cebola. Amostras de solo foram coletadas após o encanteiramento para determinação da densidade de inóculo. Para isso, três sub-amostras de solo foram coletadas por parcela com auxílio de trado holandês, antes da implantação do experimento, para formar uma amostra composta.

As parcelas foram constituídas de canteiros de 3,0 m de comprimento por 1,25 m de largura, com quatro fileiras de plantas, perfazendo uma área de 3,75 m^2. O semeio foi realizado com espaçamento de 0,3 m entre fileiras e 0,1 m entre plantas nas fileiras. A parcela útil foi considerada as duas linhas centrais, descartando-se 0,5 m em cada extremidade da linha.

Os produtos foram aplicados no semeio e aos 30, 60 e 75 dias após o semeio com o auxílio de pulverizador costal pressurizado por CO_2 a 296 kPa, munido de barra com dois bicos tipo leque 11002, distanciados 0,5 m entre si. O cultivo durou 140 dias.

O delineamento experimental adotado foi do tipo blocos ao acaso com oito repetições e cada parcela útil foi considerada como unidade experimental. As médias das temperaturas máxima, média e mínima, foram 30 ºC, 25 ºC e 19 ºC, respectivamente. As temperaturas foram coletadas diariamente pela estação meteorológica da UFV-CRP.

RESULTADOS

Crescimento de *Trichoderma* spp. a 11 ºC

Os isolados de *Trichoderma* GF424, GF426, GF417-1, GF425-1, GF423, GF418, GF39, GF420 (experimento 1), GF79, GF427-2, GF337 e GF 371 (experimento 2) tiveram maior crescimento micelial em temperatura de 11 ºC, aos seis e quatro dias nos experimentos 1 e 2, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Área da colônia de *Trichoderma* spp. em meio batata dextrose ágar (BDA) após cultivo por seis ou quatro dias (Experimento 1 ou 2, respectivamente) em BOD a 11 ºC.

Isolado	Área (cm²)	Isolado	Área (cm²)
GF424, GF426, GF418, GF417-1, GF425-1, GF423, GF39, GF420	26,78 – 23,72 a	GF79, GF427-2, GF337, GF371	26,78 – 16,77 a
GF66, GF44, GF427-1, GF357, GF417-2, GF419-1, GF121, GF441, GF421, GF428	22,61 – 17,79 b	GF425-2, GF45, GF221, GF426-2, GF75	8,89 – 7,83 b
GF25, GF419-2, GF422-1, GF354, GF126, GF332, GF53, GF60, GF56, GF327	16,60 – 7,02 c	GF03, GF440, GF422-2	5,47 – 5,19 c
		GF361	3,79 d
		GF116, GF119, GF04	2,56 e
CV (%)	20,91		8,58

Média de três repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade. * Valores transformados para $\log_{10}(x)$ antes da análise de variância. Médias originais são apresentadas na tabela.

Vinte e seis isolados do fungo produziram micélio denso e esporulação aparente aos 15 dias de cultivo (Tabela 2). Essas características são importantes para a produção massal de agentes de biocontrole e podem ser indicativo de crescimento e reprodução rápida no ambiente.

Tabela 2. Avaliação visual da densidade do micélio e esporulação de isolados de *Trichoderma* spp. cultivados em meio batata dextrose ágar (BDA) por 15 dias em BOD a 11 ºC.

Isolado	Micélio denso	Esporulação evidente
GF424, GF 426, GF417-1, GF425-1, GF423, GF39, GF420, GF427-2, GF337, GF371, GF354, GF126, GF03, GF422-2, GF44, GF357, GF121, GF441, GF421, GF428, GF425-2, GF45, GF221, GF426-2, GF75, GF25	sim	sim

* Continua...

Tabela 2. *Continuação. Avaliação visual da densidade do micélio e esporulação de isolados de *Trichoderma* spp. cultivados em meio batata dextrose ágar (BDA) por 15 dias em BOD a 11 ºC.

Isolado	Micélio denso	Esporulação evidente
GF422-1, GF53, GF327, GF361	sim	não
GF427-1, GF419-1, GF419-2, GF332, GF60, GF56, GF440, GF116, GF119, GF04	não	sim
GF418, GF 417-2, GF 79, GF66	não	não

Antagonismo de *Trichoderma* spp. a *Sclerotium cepivorum* 'in vitro'

Os isolados de *Trichoderma* GF417-1, GF420, GF424, GF425-1 e GF426 reduziram a germinação de escleródios de *S. cepivorum* em ambos os experimentos (Tabela 3). A germinação de escleródios que entraram em contato com esses isolados foi de 23,54 %, enquanto que na testemunha esse valor foi de 96,67 %.

Tabela 3. Efeito de isolados de espécies de *Trichoderma* na germinação e colonização de escleródios de *Sclerotium cepivorum* em laboratório.

Isolado	Germinação (%)	Escleródios colonizados (%)	Germinação (%)	Escleródios colonizados (%)
	Experimento 1		Experimento 2	
Testemunha	95,00 ab	0 c	98,33 a	0 e
GF39	73,02 abc	26,60 bc	73,05 a	26,60 de
GF337	100 a	83,33 a	15,37 b	78,38 abc
GF371	98,33 a	68,33 a	0 b	53,75 bcd
GF417-1	61,67 bcd	38,33 abc	10,37 b	45,74 cd
GF420	35,37 def	81,29 a	0 b	59,07 bcd
GF423	100,0 a	0 c	100 a	0 e
GF424	15,27 f	66,57 ab	0 b	97,61 a
GF425-1	53,33 cde	33,33 abc	8,51 b	62,45 abcd
GF426	23,94 ef	70,50 ab	27,08 b	78,33 abc
GF427-2	96,67 a	0 c	16,22 b	88,73 ab
CV (%)	26,29	62,02	47,81	35,69

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A colonização dos escleródios foi maior em placas onde os isolados GF337, GF371, GF420, GF424 e GF426 foram aplicados, resultando em média de 73,7 % das estruturas de resistência do patógeno sendo hiperparasitadas por *Trichoderma* (Tabela 3). Nenhum escleródio foi colonizado por *Trichoderma* no tratamento controle, descartando a possibilidade de contaminação cruzada entre as parcelas (Tabela 3).

De forma geral, os isolados GF420, GF424 e GF426 foram os mais consistentes na redução da germinação do patógeno (>80%) e na colonização dos

escleródios (>70 %) em ambos os experimentos. Além disso, esses isolados também crescem e esporulam a temperatura de 11 °C (Tabelas 1 e 2), temperatura considerada não adequada para a maioria dos isolados de *Trichoderma*, mas essencial para adaptação de potenciais antagonistas de *S. cepivorum*. Em razão desses fatores, tais isolados foram selecionados para avaliação em experimentos em laboratório, casa de vegetação e em campo.

Antagonismo de *Bacillus* a *Sclerotium cepivorum* 'in vitro'

Os cinco isolados de *Bacillus* spp. reduziram a germinação de escleródios de *S. cepivorum* em 80 %, no mínimo (Tabela 4). Além disso, todos os isolados colonizaram mais de 65 % dos escleródios. Na testemunha, nenhum escleródio foi colonizado por bactérias e o aproximadamente 98 % dos escleródios germinaram (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito de isolados de espécies de *Bacillus* na germinação e colonização de escleródios de *Sclerotium cepivorum* em laboratório aos 15 e aos 20 dias.

Isolado	Germinação (%)	Escleródios colonizados (%) – pós-incubação* a 25 ºC	Escleródios colonizados (%) – pós-incubação* a 28 ºC
		15 dias	
Testemunha	96,67 a	0 b	0 b
GF33	0 b	96,67 a	96,67 a
GF63	0 b	100 a	100 a
GF203	3,3 b	93,33 a	93,33 a
GF266	3,3 b	86,67 a	86,67 a
GF340	0 b	100 a	100 a
CV (%)	33,52	12,59	12,59
		20 dias	
Testemunha	100 a	0 c	0 c
GF33	16,67 b	83,33 ab	100 a
GF63	6,67 b	93,33 ab	93,33 ab
GF203	6,67 b	93,33 ab	100 a
GF266	20 b	66,67 b	73,33 b
GF340	0 b	100 a	100 a
CV (%)	70,59	25,99	17,98

Média de seis repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna em cada data de avaliação não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. *Escleródios foram tratados com suspensão bacteriana e incubados a 16 ºC por 20 dias, seguido de desinfestação superficial e incubação por sete dias a 25 ºC e por mais sete dias a 28 ºC.

Assim os isolados GF33, GF63, GF203, GF266 e GF340 tem potencial para controlar *S. cepivorum*. A escolha dos isolados GF203 e GF266 para os experimentos

seguintes ocorreu em função de seu maior desempenho durante o processo de produção massal e formulação (dados não publicados).

Aplicação de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* para o manejo da podridão-branca em laboratório, casa de vegetação e em campo

Experimentos em incubadora

Ao final de 63 dias de cultivo, apenas quatro plantas no primeiro experimento (uma tratada com *Trichoderma* spp. GF 426, uma com *Trichoderma* spp. GF 420 e duas com *Bacillus* spp. GF 203) e duas plantas no segundo (uma tratada com *Trichoderma* spp. GF 420 e uma planta com *Bacillus* spp. GF 266) apresentaram sintomas da doença. Nenhuma planta da testemunha desenvolveu sintomas de podridão-branca, ainda que as condições de temperatura e quantidade de escleródios no solo fossem teoricamente conducivas à podridão-branca.

A altura de plantas de cebolinha não foi influenciada pela aplicação dos isolados fúngicos e bacterianos, com exceção do isolado GF 266 de *Bacillus*, que reduziu o crescimento das plantas no experimento 1 (Tabela 5). Em ambos os experimentos, plantas onde o fungicida triadimenol foi aplicado cresceram de forma similar ao controle não tratado.

Tabela 5. Altura de plantas de cebolinha cultivadas em solo infestado com *Sclerotium cepivorum* e tratadas com isolados fúngicos e bacterianos aos após 63 dias de cultivo em BOD a 16 ºC com fotoperíodo de 12 horas de luz.

Experimento 1		Experimento 2	
Isolado	Altura (cm)	Isolado	Altura (cm)
Trichoderma GF 424	30,61 abc	*Trichoderma* GF 424	28,54 ab
Trichoderma GF 426	34,15 bc	*Trichoderma* GF 426	32,4 a
Trichoderma GF 420	34,15 ab	*Trichoderma* GF 420	32,58 a
Bacillus GF 203	37,07 a	*Bacillus* GF 203	23, 42 b
Bacillus GF 266	27,05 c	*Bacillus* GF 266	30,10 ab
Triadimenol	31,12 abc	Triadimenol	29,77 ab
Testemunha	35,34 ab	Testemunha	27,58 ab
CV (%)	12,45		16,44

Média de sete repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Experimentos em casa de vegetação e em campo

Nos dois experimentos em casa de vegetação e no experimento de campo não houve incidência da doença, mesmo após 140 dias de cultivo de cebola em solo infestado. Assim, não foi possível avaliar o potencial dos GF420, GF424 e GF426 de *Trichoderma* e GF203 e GF266 de *Bacillus* no manejo de *S. cepivorum* em condições não controladas.

DISCUSSÃO

Os isolados GF420, GF424 e GF426 de *Trichoderma* spp. e GF33, GF63, GF203, GF266 e GF340 de *Bacillus* spp. colonizam e reduzem a germinação de escleródios de *S. cepivorum*, mesmo quando submetidos a temperatura de 16 ºC. A adaptação de agentes de controle biológico a temperaturas entre 13 e 18 ºC é crítica para o manejo da podridão-branca. Em campo, a germinação de escleródios do patógeno ocorre nessa faixa de temperatura (COLEY-SMITH *et al*., 1990), em resposta também a estímulos químicos associados às plantas hospedeiras do fungo, como, por exemplo, exsudatos radiculares, extratos ou óleos de espécies de *Allium* (STEWART & McLEAN, 2007; VILLALTA *et al*., 2012). Logo, após germinar, o fungo produz hifa e penetra diretamente nas raízes do hospedeiro, localizadas a até 2 cm dos escleródios (FUGA *et al*., 2012). Dessa forma, a inativação ou morte dos escleródios de *S. cepivorum* é a principal forma de reduzir drasticamente a doença no campo, uma vez que o patógeno não produz esporos e os escleródios podem permanecer viáveis no solo por até 20 anos (COLEY-SMITH et al., 1990).

A ação de agentes de biocontrole na morte ou enfraquecimento de escleródios de *S. cepivorum* ocorre principalmente pela produção de compostos tóxicos e, ou hiperparasitismo. Espécies de *Trichoderma* e *Bacillus* produzem enzimas, antibióticos, compostos voláteis e ácidos que inibem fitopatógenos, sendo um dos principais mecanismos de ação desses antagonistas (CAWOY *et al*., 2011; SILVA *et al*., 2011; OLMEDO-MONFIL & CASAS-FLORES, 2014). Bactérias do gênero *Bacillus* são conhecidas por produzirem vários compostos microbianos (CAWOY *et al*., 2011), o que sugere que seja a antibiose o principal mecanismo de ação dos isolados GF33, GF63, GF203, GF266 e GF340. Cerca de 4-5 % do genoma de *B. subtilis*, por exemplo, é composto de genes associados à síntese de antibióticos (STEIN, 2005). Espécies de *Trichoderma*, por sua vez, são mais comumente associadas à colonização e degradação de estruturas de resistências de patógenos, ainda que também produzam substâncias tóxicas (DENNIS & WEBSTER, 1971; OLMEDO-MONFIL & CASAS-FLORES,

2014). Exoglucanases e endoglucanases, celobiases e quitinases secretadas por *Trichoderma* degradam e causam lise da parede celular de fungos fitopatogênicos (PAPAVIZAS, 1985).

Ainda que o mecanismo de ação dos isolados de *Bacillus* e *Trichoderma* selecionados neste trabalho necessite ser desvendado no futuro, comprovamos que esses organismos possuem potencial para uso no manejo da podridão-branca. No entanto, o uso desses isolados como ferramentas adicionais de manejo ainda requer validação em campo. Neste trabalho, os experimentos em incubadora, casa de vegetação e de campo não puderam ser usados para esse propósito, pela ausência da doença no tratamento controle. Em todos os experimentos, a densidade média de 50 a 80 escleródios por kg de solo é capaz de causar doença em plantas suscetíveis (MERRIMAN *et al*., 1984), a exemplo da cebolinha cv. Cristobal e da cebola cv. Perfecta. Solo infestado com 1 a 100 escleródios/kg podem resultar em perdas de 10 a 100 % em culturas de alho e cebola (CROWE *et al*., 1980). Assim, era de se esperar que pelo menos níveis moderados da doença ocorressem, considerando apenas a densidade de inóculo e a presença da planta suscetível. No entanto, o ambiente foi o principal fator que impediu o aparecimento da podridão-branca nos experimentos em casa de vegetação e em campo.

A temperatura alta durante o período de bulbificação limitou a ocorrência da doença. Durante os experimentos de casa de vegetação e de campo a temperatura do ar variou entre 22-42 °C e 19-30 ºC, respectivamente. Embora a temperatura do solo não tenha sido registrada, não é difícil inferir que os valores tenham sido maiores do que 13-18 °C na maior parte do cultivo da cebola (CROWE & HALL, 1980; COLEY-SMITH *et al*., 1990), faixa ideal para a germinação dos escleródios e crescimento de *S. cepivorum*. O mesmo efeito de temperaturas altas limitando a incidência da podridão-branca foi observado em experimentos realizados durante quatro anos em Amarantina – Minas Gerais (PINTO *et al*., 1998). O plantio de alho em janeiro ou até o final de fevereiro limitou a ocorrência da podridão-branca em comparação com plantio março, abril e maio - tradicionais épocas do início do cultivo de alho (PINTO *et al*., 1998). A doença não foi observada quando o plantio ocorreu no dia 28 de janeiro de 1986 e 1987 e 15 de janeiro de 1988 (PINTO *et al*., 1998). Nesse caso, a temperatura do solo nos primeiros meses do ano (>20 °C) não favoreceu a ocorrência da doença, mesmo com densidade de inóculo de 140 a 570 escleródios/kg de solo (PINTO *et al*., 1998). Assim, da mesma forma que o plantio antecipado de alho, o semeio tardio da cebola também não favorece o aparecimento da doença. Ainda que os dados de produção não estejam disponíveis no trabalho de PINTO *et al.* (1998) e nem no presente trabalho, a principal

limitação de antecipar ou retardar o plantio é a redução da quantidade e da qualidade dos bulbos produzidos, quando comparados com o plantio nas épocas tradicionais.

O semeio dos experimentos era para ter ocorrido em abril ou maio e não nos meses de junho e julho, e o alho seria a cultura usada, ao invés da cebola. No entanto, vários fatores influenciaram para os experimentos fossem conduzidos fora da época ideal para a ocorrência da doença. O verão de 2014-2015 foi marcado pelo baixo índice pluviométrico e, por isso, muitos produtores do Alto Paranaíba diminuíram áreas de plantio e desativaram ou reduziram uso de irrigação suplementar em vários locais, principalmente em pivôs ou setores com reboleiras de *S. cepivorum*. Além disso, muitos produtores não tinham sementes de alho disponíveis para plantio próprio e tampouco para fornecimento para pesquisa. No Brasil, o plantio de alho é restrito ao primeiro semestre do ano (março-abril), pela necessidade de período de inverno para bulbificação. A área experimental com irrigação foi liberada para cultivo apenas no mês de junho, na COOPADAP. Assim, a decisão pelo cultivo de cebola foi devido à facilidade de conseguir sementes e menor dependência de frio do que o alho. Era de se esperar que a incidência da doença não fosse alta devido ao plantio tardio. No entanto, havia a possibilidade de que mesmo sob baixos níveis da podridão-branca fosse possível selecionar pelo menos um isolado para etapas futuras de desenvolvimento de biofungicida para o manejo da doença.

No experimento em incubadora, a temperatura ambiente de 16 °C foi ajustada favorecer a ocorrência da doença. No entanto, ainda assim nenhuma planta no tratamento controle ficou doente, apenas poucas plantas onde foram aplicados *Trichoderma* ou *Bacillus*. Nesse caso, a variabilidade entre os escleródios usados em relação à dormência constitutiva pode ter influenciado nos resultados. Ainda que a germinação dos escleródios tenha sido avaliada e a que a densidade total de 50 escleródios/ kg de solo seja suficiente para causar doença (MERRIMAN *et al*., 1984), é possível que parte dos escleródios estivesse dormente, reduzindo assim o potencial de inóculo do fungo. Em alguns casos, é necessário que o fungo seja incubado em solo por até seis meses, para que a dormência constitutiva seja quebrada e taxas de germinação superiores a 89 % sejam observadas (McLEAN *et al.*, 2005).

Os isolados GF420, GF424 e GF426 de *Trichoderma* spp. e GF33, GF63, GF203, GF266 e GF340 de *Bacillus* spp. colonizam e reduzem a germinação de escleródios de *S. cepivorum*, mesmo quando submetidos a temperatura de 16 ºC. A identificação das espécies dos antagonistas e, principalmente, novos experimentos em

condições de campo devem ser conduzidos nas épocas tradicionais de plantio para avaliar o potencial dos isolados no manejo da podridão-branca.

CONCLUSÕES GERAIS

- Doze dos 44 isolados de *Trichoderma* crescem a 11 ºC.
- Os isolados GF420, GF424 e GF426 de *Trichoderma* e GF33, GF63, GF266 e GF340 de *Bacillus* colonizam e reduzem em mais de 80 % a germinação de escleródios de *S. cepivorum* a 16 ºC.
- A altura de plantas de cebolinha não é influenciada pela aplicação dos isolados fúngicos e bacterianos, com exceção do isolado GF 266 de *Bacillus*, que reduz o crescimento das plantas.
- A aplicação do fungicida triadimenol não influencia o crescimento de plantas de cebolinha cultivadas em incubadora do tipo BOD.
- Plantas de cebola cultivadas em casa de vegetação e campo em solo infestado com sete escleródios viáveis de *S. cepivorum* com temperaturas do ar entre 22-42 ºC e 19-30 ºC, respectivamente, não desenvolvem sintomas de podridão-branca. Assim, o potencial dos isolados GF420, GF424 e GF426 de *Trichoderma* e GF33, GF63, GF266 e GF340 de *Bacillus* para o manejo de *S. cepivorum* em condições não controladas deve ser avaliado em novos experimentos em condições mais favoráveis à ocorrência da doença.

LITERATURA CITADA

AVILA-MIRANDA, M.E.; HERRERA-ESTRELL, A. & PEÑA CABRIALES, J.J. 2006. Colonization of the rhizosphere, rhizoplane and endorhiza of garlic (*Allium sativum* L.) by strains of *Trichoderma harzianum* and their capacity to control *Allium* white-rot under field conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 1823-1830, 2006.

CAWOY, H.; BETTIOL, W.; FICKERS, P.; ONGENA, M. *Bacillus*-based biological control of plant diseases, pesticides in the modern world. In: STOYTCHEVA, M. (Ed). **Pesticides Use and Management**. InTech, Rijeka, p. 273-302, 2011.

CLARKSON, J. P.; PAYNE, T.; MEAD, A.; WHIPPS, J. M. Selection of fungal biological control agents of *Sclerotium cepivorum* for control of white rot by sclerotial degradation in a UK soil. **Plant Pathology**, v. 51, p. 735-745, 2002.

CLARKSON, J.P.; MEAD, A.; PAYNE, T.; WHIPPS, J.M. Effect of environmental factors and *Sclerotium cepivorum* isolate on sclerotial degradation and biological control of white rot by *Trichoderma*. **Plant Pathology**, v. 53, p. 353-362, 2004.

COLEY-SMITH, J. R.; MITCHELL, C. M.; ANSFORD, C. E. Long-term survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and *Stromatinia gladioli*. **Plant Pathology**, v. 39, p. 58-69, 1990.

CROWE, F. J.; HALL, D. H.; GREATHEAD, A. S.; BAGHOTT, K. G. Inoculum density of *Sclerotium cepivorum* and the incidence of white rot of onion and garlic. **Phytopathology**, v. 70, p. 64-69, 1980.

CROWE, F.J.; HALL, D.H. Soil temperature and moisture effects on sclerotium germination and infection of onion seedlings by *Sclerotium cepivorum*. **Phytopathology**, v. 70, p. 74-80, 1980.

CRUZ, R.; HERNÁNDEZ-CASTILLO, F. D.; GALLEGOS-MORALES, G.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; AGUILAR-GONZÁLEZ, C. N.; PADRÓN-CORRAL, E.; REYES-VALDÉS, M. H. *Bacillus* spp. como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). **Revista Mexicana de Fitopatología**, v. 24, p. 105-114, 2006.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal interactions. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, p. 359-363, 1971.

DOORNBOS, R.F.; LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, p. 227–243, 2012.

EARL, A. M.; LOSICK, R.; KOLTER, R. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. **Trends in Microbiology**, v. 16, p. 269-275, 2008.

FUGA, C. A. G.; LOPES, E. A.; VIEIRA, B. S. Etiologia, epidemiologia e controle de doenças causadas por *Sclerotium rolfsii* e *S. cepivorum*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 20, p. 278-322, 2012.

LI, J., YANG, Q., ZHAO, L., ZHANG, S., WANG, Y., ZHAO X. Purification and characterization of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* strain B29. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 10, p.264–272, 2009.

McLEAN, K.L.; STEWART, A. Application strategies for control of onion white rot by fungal antagonists. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 28, p. 115-122, 2000.

McLEAN, K.L.; HARPER, G.E.; FRAMPTON, C.M.; STEWART, A. Dormancy of *Sclerotium cepivorum* sclerotia in New Zealand soils. **New Zealand Plant Protection**, v. 58, p. 245-250, 2005.

McLEAN, K.L.; SWAMINATHAN, J.; STEWART, A. Increasing soil temperature to reduce sclerotial viability of *Sclerotium cepivorum* in New Zealand soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, p. 137-143, 2001.

MELERO-VARA, J.M.; PRADOS-LIGERO, A.M.; BASALLOTE-UREBA, M.J. Comparison of physical, chemical and biological methods of controlling garlic white rot. **European Journal of Plant Pathology**, v. 106, p. 581-588, 2000.

MERRIMAN, P. R.; ISAACS, S.; MacGREGOR, R. R.; TOWERS, G. B. Control of white rot in dry bulb onions 1981-82 and 1982-83. **Fungicide and Nematicide Tests**, v. 40, p. 76-77, 1984.

MUKHERJEE, P. K.; HORWITZ, B. A.; HERRERA-ESTRELLA, A.; SCHMOLL, M.; KENERLEY, C. M. *Trichoderma* research in the genome era. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, p. 105–129, 2013.

OLMEDO-MONFIL, V.; CASAS-FLORES, S. Molecular mechanisms of biocontrol in *Trichoderma* spp. and their applications in agriculture. In: GUPTA, V.; SCHMOLL, M.; HERRERA-ESTRELLA, A.; UPADHYAY, R.; DRUZHININA, I.; TUOHY, M. (Eds). **Biotechnology and Biology of *Trichoderma***. Elsevier, Amsterdam, p. 429-453, 2014.

PALOP, A.; MAÑAS, P.; CONDÓN, S. Sporulation temperature and heat resistance of Bacillus spores: A review. **Journal of Food Safety**, v. 19, p. 57–72, 1999.

PAPAVIZAS, G.C. Isolation and enumeration of propagules of *Sclerotium cepivorum* from soil. **Phytopathology**, v. 62, p. 545-549, 1972.

PAPAVIZAS, G.C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, v.23, p.23-54, 1985.

PINTO, C. M. F.; MAFFIA, L. A.; BERGER, R. D.; MIZUBUTI, E. S. G.; CASALI, V. W. D. Progress of white rot on garlic cultivars planted at different times. **Plant Disease**, v. 82, p.1142-1146, 1998.

SILVA, B. D.; ULHOA, C. J.; BATISTA, K. A.; YAMASHITA, F.; FERNANDES, K. F. Potential fungal inhibition by immobilized hydrolytic enzymes from *Trichoderma asperellum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 8148-8154, 2011.

SINGH, A.; SHAHID, M.; SRIVASTAVA, M.; PANDEY, S.; SHARMA, A.; KUMAR, V. Optimal physical parameters for growth of *Trichoderma* species at varying ph, temperature and agitation. **Virology and Mycology**, v. 3, p.127-133, 2014.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, v. 56, p. 845-857, 2005.

STEWART, A.; MCLEAN, K. L. Biological control of onion white rot. In: CHINCHOLKAR, S.B.; MUKERJI, K.G. (Ed.). **Biological Control of Plant Diseases**. The Haworth Press, New York, p.123-48, 2007.

UTKHEDE, R. S.; RAHE, J. E. Biological control of white rot. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 12: 101-104, 1980.

UTHSCSA. **ImageTool, versão 3.0**. Disponível em: http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html. Acesso em 15 de Julho, 2014.

VILLALTA, O. N.; WITE, D.; PORTER, I. J.; McLEAN, K. L.; STEWART, A.; HUNT, J. Integrated control of onion white rot on spring onions using diallyl disulphide, fungicides and biocontrols. **Acta Horticulturae**, v. 944, p. 63-71, 2012.

VIMARD, B.; LEGGET, M.E.; RAHE, J.E. Rapid isolation of sclerotia os *Sclerotium cepivorum* from muck soil by sucrose centrifugation. **Phytopathology**, v. 76, p. 465-467, 1986.

WONG W. C.; HUGHES I. K. *Sclerotium cepivorum* Berk. in onion (*Allium cepa* L.) crops: isolation and characterization of bacteria antagonistic to the fungus in Queensland. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 60, p. 57-60, 1986.