**SELEÇÃO “IN VITRO” E EM CÂMARA DE CRESCIMENTO
DE FUNGICIDAS E ANTAGONISTAS PARA O CONTROLE DE
Sclerotium cepivorum BERK., AGENTE CAUSAL
DA PODRIDÃO BRANCA DA CEBOLA (*Allium cepa* L.)**

DANIELA BIAGGIONI LOPES
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. HIROSHI KIMATI

**Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura “Luiz de
Queiroz”, da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Mestre em
Agronomia. Área de Concentração:
Fitopatologia.**

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Maio - 1994

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLQ/USP

Lopes, Daniela Biaggioni

L864s Seleção "in vitro" e em câmara de crescimento de fungicidas e antagonistas para o controle de *Sclerotium cepivorum* Berk.; agente causal da podridão branca da cebola (*Allium cepa* L.). Piracicaba, 1994. 67p.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Cebola - Doença - Controle 2. Fungicida - Controle 3. Fungo fitopatogênico 4. Microrganismo para controle biológico 5. Podridão branca da cebola I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 632.44
635.25

**SELEÇÃO “IN VITRO” E EM CÂMARA DE CRESCIMENTO
DE FUNGICIDAS E ANTAGONISTAS PARA O CONTROLE DE
Sclerotium cepivorum BERK., AGENTE CAUSAL
DA PODRIDÃO BRANCA DA CEBOLA (*Allium cepa* L.)**

DANIELA BIAGGIONI LOPES

Aprovada em: 09.06.1994

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Hiroshi Kimati
Prof. Dr. Eric Balmer
Prof.^a Dr.^a Margarete Camargo

ESALQ/USP
ESALQ/USP
FCAVJ/UNESP

Prof. Dr. Hiroshi Kimati
Orientador

Dedico

aos meus familiares

e ao Fabiano

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Hiroshi Kimati, que através da sua orientação, contribuiu para o meu aperfeiçoamento pessoal e científico.

Aos colegas, professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP, pelos ensinamentos, amizade, interesse e carinho.

À colega Maria Edna T. Nunes, pela revisão dos originais.

Ao Prof. Armando Bergamin Filho, pelo apoio e contribuição na edição final do texto.

Ao meu marido, Fabiano Toni, pela compreensão, paciência e apoio, essenciais para a elaboração desta dissertação.

Ao CNPq e à FAPESP, pela concessão das bolsas de estudo.

SUMÁRIO

	página
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	viii
SUMMARY	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Etiologia e sintomatologia da doença	4
2.2. Controle da doença	6
2.2.1. Controle químico	7
2.2.2. Controle biológico	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. Experimentos “in vitro”	17
3.1.1. Obtenção de isolados de <i>Sclerotium cepivorum</i>	17
3.1.2. Obtenção de isolados de antagonistas	18
3.1.3. Testes com fungicidas	19
3.1.4. Testes com antagonistas	21
3.2. Experimentos “in vivo”	23
3.2.1. Métodos de inoculação	23
3.2.2. Controle químico	25
3.2.3. Controle biológico	27
4. RESULTADOS	29
4.1. Experimentos “in vitro”	29

4.1.1. Testes com fungicidas	29
4.1.2. Obtenção de isolados de antagonistas	30
4.1.3. Testes com antagonistas	33
4.2. Experimentos “in vivo”	36
4.2.1. Métodos de inoculação	36
4.2.2. Controle químico	41
4.2.3. Controle biológico	43
5. DISCUSSÃO	47
5.1. Experimentos “in vitro”	47
5.1.1. Testes com fungicidas	47
5.1.2. Testes com antagonistas	48
5.2. Experimentos “in vivo”	50
5.2.1. Métodos de inoculação	50
5.2.2. Controle químico	51
5.2.3. Controle biológico	54
6. CONCLUSÕES	60
7. LITERATURA CITADA	62

LISTA DE TABELAS

	página
Tabela 1 - Efeito de diferentes dosagens de oito fungicidas no crescimento micelial de <i>Sclerotium cepivorum</i> (isolado A2)	30
Tabela 2 - Efeito da dosagem de 0,1 ppm de quatro fungicidas no crescimento micelial de três isolados de <i>Sclerotium cepivorum</i>	31
Tabela 3 - Efeito da dosagem de 0,5 ppm de quatro fungicidas no crescimento micelial de três isolados de <i>Sclerotium cepivorum</i>	31
Tabela 4 - Efeito de diferentes dosagens de seis fungicidas no crescimento micelial de <i>Sclerotium cepivorum</i> (isolado A2)	33
Tabela 5 - Efeito de diferentes métodos de isolamento na obtenção de fungos antagônicos a <i>Sclerotium cepivorum</i> e sobre a eficiência destes em inibir o crescimento micelial e a produção de escleródios pelo patógeno	34
Tabela 6 - Efeito de diferentes métodos de isolamento na obtenção de bactérias antagônicas a <i>Sclerotium cepivorum</i> e sobre a eficiência destas em induzir a formação de halos	34
Tabela 7 - Efeito de isolados de fungos, obtidos por diferentes métodos de isolamento, sobre o crescimento micelial e a formação de escleródios por <i>Sclerotium cepivorum</i>	36
Tabela 8 - Efeito de isolados de bactérias, obtidos por diferentes métodos de isolamento, sobre a indução de halo de inibição e a formação de escleródios por <i>Sclerotium cepivorum</i>	37
Tabela 9 - Efeito de diferentes métodos de inoculação de <i>Sclerotium cepivorum</i> na sobrevivência e peso da parte aérea de plantas de cebola em condições de câmara de crescimento	38
Tabela 10 - Efeito de diferentes fungicidas “in vivo” (câmara de crescimento) no controle da podridão branca da cebola	41
Tabela 11 - Efeito “in vivo” (câmara de crescimento) de diferentes antagonistas de <i>Sclerotium cepivorum</i> no controle da podridão branca da cebola	44

LISTA DE FIGURAS

	página
Figura 1 - Efeito de duas dosagens de diferentes fungicidas no crescimento micelial “in vitro” de três isolados de <i>Sclerotium cepivorum</i> (A2, SA e S3)	32
Figura 2 - Sobrevivência de plantas de cebola em função do método de inoculação com <i>Sclerotium cepivorum</i>	39
Figura 3 - Peso da parte aérea de plantas de cebola em função do método de inoculação com <i>Sclerotium cepivorum</i>	40
Figura 4 - Efeito “in vivo” (câmara de crescimento) de duas dosagens de diferentes fungicidas no controle da podridão branca da cebola	42
Figura 5 - Efeito “in vivo” (câmara de crescimento) de antagonistas de <i>Sclerotium cepivorum</i> no controle da podridão branca da cebola ..	45

**SELEÇÃO “IN VITRO” E EM CÂMARA DE CRESCIMENTO
DE FUNGICIDAS E ANTAGONISTAS PARA O CONTROLE DE
Sclerotium cepivorum BERK., AGENTE CAUSAL
DA PODRIDÃO BRANCA DA CEBOLA (*Allium cepa* L.)**

**Autora: DANIELA BIAGGIONI LOPES
Orientador: PROF. HIROSHI KIMATI**

RESUMO

Testes “in vitro” e “in vivo” (condições de câmara de crescimento) foram realizados com o objetivo de selecionar fungicidas e microrganismos antagonísticos para o controle da podridão branca da cebola causada por *Sclerotium cepivorum*.

Nos testes em câmara de crescimento, as inoculações foram feitas em solo não esterilizado, com escleródios produzidos em laboratório, antes do transplante de mudas de cebola. As avaliações foram feitas doze semanas após o transplante das mudas, com a determinação da porcentagem de sobrevivência e do peso da parte aérea das plantas de cada parcela.

Os fungicidas foram aplicados em rega, na ocasião do transplante das mudas. Os produtos tebuconazole, procymidone, vinclozoline, fluazinam e triadimefon tiveram bom desempenho “in vivo”, controlando eficientemente a doença, o que concordou, de modo geral, com os resultados “in vitro”. Tebuconazole, triadimefon e diniconazole provocaram sintomas de fitotoxidez em algumas das dosagens testadas.

Os microrganismos selecionados “in vitro”, a partir de testes de cultura pareada, foram cultivados em caldo (BD) e aplicados (uma ou duas vezes) em tratamento de solo. Os tratamentos com antagonistas aumentaram a sobrevivência das plantas, mas este aumento não foi estatisticamente significativo.

**“IN VITRO” AND GROWTH CHAMBER SCREENING OF
FUNGICIDES AND ANTAGONISTS TO THE CONTROL OF
Sclerotium cepivorum BERK., CAUSAL AGENT OF ONION
(*Allium cepa* L.) WHITE ROT**

**Author: DANIELA BIAGGIONI LOPES
Adviser: PROF. HIROSHI KIMATI**

SUMMARY

“In vitro” and “in vivo” (growth chamber) tests were carried out to screening fungicides and antagonists to the control of onion white rot caused by *Sclerotium cepivorum*.

Inoculations in tests under growth chamber conditions were carried out in non sterilized soil, with laboratory produced sclerotia, before the onion plants were transplanted. Assessments were made twelve weeks later, determining the percentage of survival and the above ground weight of plants of each plot.

The fungicides were applied to the soil when the onion plants were being transplanted. The products tebuconazole, procymidone, vinclozolin, fluazinam and triadimefon controlled onion white rot efficiently under controlled environmental conditions, in agreement to the “in vitro” results. However, tebuconazole, triadimefon and diniconazole were phytotoxic to onion, at some of the tested rates.

The antagonistic isolates selected “in vitro” were grown in potato dextrose broth and applied (one or two applications) to the infested soil. The antagonists visually increased plant survival, but this increase was not statistically significant.

1. INTRODUÇÃO

Dentre os fatores que limitam a produtividade da cultura da cebola (*Allium cepa* L.), por vezes inviabilizando seu cultivo em áreas muito infestadas, está a doença conhecida como podridão branca. Esta doença, causada pelo fungo *Sclerotium cepivorum* Berk., afeta também as culturas do alho (*Allium sativum* L.), alho-poró (*Allium porrum* L.) e cebolinha (*Allium fistulosum* L.).

A podridão branca foi descrita pela primeira vez pelo reverendo M.J. Berkeley, na Inglaterra, em 1841, e é, desde então, uma doença sempre reconhecida em plantios de cebola em todo o mundo. COLEY-SMITH (1987) comenta que altos níveis de infestação foram relatados em países como Austrália, Canadá, Inglaterra, Finlândia, Itália, Holanda, Estados Unidos e Egito. Nestes países, muitos produtores foram obrigados a deixar de plantar cebola em áreas severamente infestadas pelo patógeno.

O potencial destrutivo da podridão branca pode ser evidenciado pela situação da cebola no Egito, onde, até 1965, era uma das principais culturas de exportação, ocupando uma área de 20.000 hectares, e fornecendo 160.000 toneladas do produto para exportação. Já em 1978, a área plantada com esta cultura caiu para 8.000 hectares, produzindo apenas 30.000 toneladas de cebola em condições de ser exportada. Esta situação reflete o aumento da contaminação dos solos do vale do Rio Nilo por *S. cepivorum* (Abd-El- Moity¹, citado por COLEY-SMITH, 1987).

No Brasil, a podridão branca é uma das mais importantes doenças da cultura do alho, com ocorrência generalizada nas regiões serranas dos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul (RESENDE, 1985). Recentemente, o problema vem se agravando também em plantações de cebola de municípios produtores do estado de São Paulo, como São José do Rio Pardo (NUNES & FERREIRA, 1989).

¹ Abd-El-Moity, T.H. The situation of white rot disease in Egypt. Proceedings of the First International Workshop on *Allium* white rot. Wageningen, The Netherlands, p.14-15, 1979.

A podridão branca de *Allium* spp. ocorre, inicialmente, em reboleiras, com perdas insignificantes de produção em campos anteriormente livres do patógeno. No entanto, as perdas tendem a ser muito maiores caso estes campos sejam replantados com liliáceas (CROWE *et al.*, 1980). COLEY-SMITH (1987) relata que, nas áreas produtoras de cebola da Inglaterra, onde são feitos cultivos sucessivos, ocorre, com frequência, um padrão definido de evolução da infestação: no primeiro ano em que a doença é introduzida na área, os níveis da podridão branca são baixos, muito próximos de zero; no segundo ano, a incidência é de aproximadamente 5%; no terceiro ano de plantio, a incidência atinge 30% da população de plantas; já no ano seguinte, o cultivo de cebola torna-se economicamente inviável naquele campo.

Além de ser uma enfermidade com potencial de causar elevadas perdas, a podridão branca de *Allium* spp. é de difícil controle. O uso de variedades resistentes para o controle desta doença não é considerado promissor por COLEY-SMITH (1990), já que não se encontrou, até agora, um cultivar realmente resistente à doença (UTKHEDE & RAHE, 1978). COLEY-SMITH (1990) comenta, ainda, que o potencial genético do gênero *Allium* para resistência a esta doença parece ser pequeno, já que nenhuma fonte de resistência foi descoberta entre os progenitores selvagens deste gênero.

A rotação de cultura também é uma medida pouco eficiente, no caso, para reduzir o inóculo presente no solo, já que há evidências sobre a viabilidade dos escleródios de *S. cepivorum* por períodos de até 20 anos na ausência de plantas hospedeiras (COLEY-SMITH *et al.*, 1990).

O controle químico da podridão branca, apesar de oneroso, é medida essencial, ainda hoje, para a convivência com o patógeno em áreas infestadas. Contudo, sua eficiência depende de vários fatores, tais como densidade do inóculo presente no solo, modo de aplicação, formulação e dosagem do produto utilizado. Além disso, indícios começam a aparecer na literatura sobre a crescente ineficiência dos produtos atualmente recomendados, especialmente nas áreas em que estes são continuamente aplicados,

devido a um aumento na degradação microbiana destes compostos (FULLERTON & STEWART, 1991; SLADE *et al.*, 1992).

Assim sendo, faz-se necessário testar novos produtos químicos para o controle da podridão branca. Como o potencial das medidas mais usuais de controle das doenças causadas por fungos veiculados pelo solo é limitado, métodos alternativos de controle para a podridão branca de *Allium* spp. devem ser testados, dirigindo-se os esforços, preferencialmente, para a redução do inóculo no solo, como sugere COLEY-SMITH (1990).

Tendo em vista as particularidades do patossistema *S. cepivorum*-*Allium* spp., o presente trabalho teve como objetivos:

- isolar microrganismos antagônicos a *S. cepivorum* e testar a eficiência dos mesmos “in vitro” e “in vivo”;
- testar novos fungicidas para o controle de *S. cepivorum* “in vitro” e “in vivo”;
- verificar a eficiência dos métodos químico e biológico no controle da podridão branca da cebola.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Etiologia e sintomatologia da doença

A podridão branca, que afeta as espécies do gênero *Allium*, é causada pelo fungo imperfeito *Sclerotium cepivorum* Berk., pertencente à ordem Mycelia Sterilia. Esta espécie de fungo persiste no solo por longos períodos de tempo, devido à formação de numerosos escleródios. Há evidências de que os escleródios deste fungo permanecem viáveis por até 20 anos na ausência de plantas hospedeiras (COLEY-SMITH *et al.*, 1990). Estas estruturas de resistência, esféricas e pretas, com diâmetro variando de 0,3 a 0,6 mm, constituem-se no inóculo primário da doença (CROWE *et al.*, 1980). *S. cepivorum* é considerado um competidor pobre no solo, pois não exibe atividade saprofítica significativa (SCOTT, 1956).

A disseminação de *S. cepivorum* ocorre através de bulbos contaminados, de água de chuva e de irrigação que atravessam áreas contaminadas e de implementos agrícolas (KIMATI, 1980). Há, também, disseminação de uma planta para outra, através do contato dos sistemas radiculares. Neste caso, a disseminação ocorre devido ao crescimento micelial do fungo nas raízes infectadas da planta hospedeira (CROWE *et al.*, 1980).

Os escleródios conservam-se viáveis no solo devido à natureza de seu mecanismo de germinação. Após um período de dormência constitutiva de um a três meses, estas estruturas de resistência são mantidas em estado de latência pela influência fungistática do solo, só germinando em presença da planta hospedeira (COLEY-SMITH, 1960; COLEY-SMITH *et al.*, 1967).

A germinação dos escleródios independe de um contato entre estes e as raízes da planta hospedeira, e é induzida por substâncias presentes nos exsudatos de plantas de

Allium spp.; pouca ou nenhuma germinação ocorre na ausência de plantas destas espécies. O efeito das plantas de *Allium* spp. sobre o fungo resulta da presença de substâncias chamadas sulfóxidos alquil nos exsudatos de suas raízes. Estas substâncias são metabolizadas pela microflora do solo e transformam-se em sulfetos voláteis, os quais estimulam a germinação dos escleródios (COLEY-SMITH & KING, 1969; KING & COLEY-SMITH, 1969).

O tipo de germinação que ocorre no solo é eruptiva, ou seja, ocorre a emergência de uma massa ou tufo micelial através da camada externa do escleródio. As hifas emergentes infectam, então, as raízes do hospedeiro. O fungo coloniza as raízes e alcança a base do bulbo em desenvolvimento. A infecção pode ocorrer em qualquer estágio do desenvolvimento da planta (CROWE *et al.*, 1980).

A germinação dos escleródios e a infecção das plantas sofrem influência das condições do ambiente, no caso, o solo. Segundo CRUZ FILHO *et al.* (1982), as condições que favorecem a doença no Brasil (Minas Gerais) ocorrem em junho, julho e agosto. A doença é severa em terrenos de baixadas úmidas e o excesso de irrigação pode também contribuir para um progresso rápido da doença.

WALKER (1926) afirma que a infecção ocorre prontamente e o progresso da doença é mais rápido quando a temperatura do solo está entre 10 e 20°C, o que foi confirmado, mais recentemente, por ADAMS & PAPAIVIZAS (1971) e CROWE & HALL (1980).

A umidade do solo, ou mais especificamente, seu potencial matricial, tem também influência sobre a doença. WALKER (1926) relata que o maior desenvolvimento da podridão branca manifestou-se quando o solo foi mantido com 40% da sua capacidade de campo. CROWE & HALL (1980) observaram que a germinação dos escleródios, a 18°C, ocorreu entre aproximadamente -12,5 mbars e 3 bars.

Outro fator que pode influir na ocorrência da doença é o pH do solo. ADAMS & PAPAIVIZAS (1971) realizaram inoculações utilizando solo autoclavado com vários

níveis de pH e relataram que a níveis abaixo de 5 menos de 30% das plantas foram infectadas, enquanto que a níveis iguais ou acima de 6 a incidência da doença foi de 90%.

CROWE *et al.* (1980) relacionaram a densidade de inóculo de *S. cepivorum* no solo com a incidência da doença, em campos na Califórnia. Para populações menores que 0,001, entre 0,001 e 0,01, entre 0,01 e 0,1 e maiores que 0,1 escleródio por grama de solo corresponderam incidências da doença de, respectivamente, menos que 10%, 10 a 85%, 85 a 100% e 100%, por ocasião da colheita. Com densidades de inóculo maiores que 1,0 escleródio por grama de solo a maioria das plantas morreu logo após a emergência. Dependendo do estágio da cultura em que a doença manifestou-se, a população de escleródios em uma área pode aumentar dez vezes, de uma estação de cultivo para outra.

A doença manifesta-se caracteristicamente em reboleiras esparsas no campo. O patógeno penetra diretamente pelas raízes e base das folhas e coloniza inter e intracelularmente os tecidos do hospedeiro. Os sintomas iniciais são amarelecimento, murcha e queda das folhas mais externas da planta, em decorrência do apodrecimento de suas bases. As raízes também sofrem apodrecimento, permitindo que as plantas sejam facilmente arrancadas do solo. Os bulbos manifestam uma podridão basal seca, e são cobertos por um crescimento micelial branco, sob condições de alta umidade, que pode ser visto ao redor da planta, junto ao solo. Com o tempo, este bolor branco vai desaparecendo, sendo substituído por um grande número de escleródios pretos, que dão um aspecto enegrecido aos bulbos afetados (KIMATI, 1980; CRUZ FILHO *et al.*, 1982).

2.2. Controle da doença

O modo mais racional de controlar a podridão branca da cebola é, sem dúvida, a evasão, ou seja, a escolha de locais de plantio não infestados e de épocas e locais menos

favoráveis ao desenvolvimento da doença (KIMATI, 1980). No entanto, como o patógeno já se encontra largamente disseminado nas regiões produtoras de alho e cebola, medidas que reduzam a incidência da doença são freqüentemente necessárias.

Medidas de controle como rotação de cultura e utilização de variedades resistentes foram consideradas pouco viáveis à luz dos conhecimentos atuais (COLEY-SMITH, 1990). Entre os métodos promissores que vêm sendo citados na literatura (COLEY-SMITH, 1990), o presente trabalho considerou o uso de fungicidas e o uso de antagonistas de *S. cepivorum* como formas de controlar a doença, métodos estes que podem vir a fazer parte de uma estratégia de controle integrado da doença.

2.2.1. Controle químico

Segundo COLEY-SMITH (1987), uma grande variedade de fungicidas tem sido usada, com mais ou menos sucesso, no controle da podridão branca da cebola e outras espécies de *Allium*. O primeiro fungicida bem sucedido contra a podridão branca foi o cloreto mercurioso (calomel), aplicado em polvilhamento nos sulcos de plantio, em regas por ocasião do transplante ou em tratamento de sementes. O produto caiu em desuso devido a implicações ambientais e a seu alto custo. Quintozene e dicloran foram utilizados em seguida, mas sem demonstrar grande eficiência (LOCKE, 1969). Benomyl e tiofanato metílico possibilitaram controle parcial da doença (ENTWISTLE & MUNASINGHE, 1980b; RYAN & KAVANAGH, 1976a; 1976b), embora o benomyl tenha se mostrado fitotóxico quando usado em polvilhamento no sulco ou em tratamento de sementes (RYAN & KAVANAGH, 1976a; 1976b).

Mais recentemente, os produtos do grupo das dicarboximidas, tais como iprodione e vinclozoline, têm se mostrado efetivos no controle desta doença, estando registrados no Brasil para as culturas de alho e cebola. ENTWISTLE & MUNASINGHE (1980a) chegaram a bons resultados no controle da podridão branca da cebola utilizando

uma formulação granulada de iprodione, colocado na linha de semeadura, aliada a uma pulverização com o mesmo produto dirigida para a base da planta. Este tratamento resultou em um controle total da doença. Controle significativo foi alcançado com a combinação de tratamento de sementes com iprodione (25 e 50 g i.a./kg de semente) e uma pulverização dirigida para a base da planta (4,5 e 2,4 kg i.a./ha) com o mesmo fungicida (ENTWISTLE & MUNASINGHE, 1980a).

CRUZ FILHO *et al.* (1982) relataram que iprodione proporcionou melhor controle da podridão branca do alho do que PCNB, em solo com alta infestação. RESENDE & ZAMBOLIM (1987), também trabalhando com a podridão branca do alho, conseguiram controle eficiente da doença com a associação de iprodione nos bulbilhos e o mesmo iprodione ou PCNB ou formaldeído, agora no solo. Nenhum dos produtos, no entanto, reduziu efetivamente a população do fungo no solo. Os autores comentam que este resultado foi devido ao modo de ação dos fungicidas protetores (PCNB e iprodione), que foram fungistáticos na dosagem utilizada, impedindo o crescimento do micélio de *S. cepivorum* no solo e o conseqüente progresso da doença de planta para planta. RESENDE *et al.* (1987) demonstraram, ainda, que a eficiência dos fungicidas iprodione, em tratamento de solo e bulbilhos de alho, PCNB e formaldeído, estes últimos em tratamento de solo, no controle da podridão branca do alho, dependeu do nível de escleródios no solo. Segundo os autores, os tratamentos com formaldeído ou PCNB no solo, associados com iprodione nos bulbilhos, mostraram-se promissores, principalmente em áreas mais infestadas, no sentido de substituir o tratamento de solo com iprodione, de custo muito elevado.

Outro produto do grupo das dicarboximidas, o procymidone, tem mostrado resultados promissores no controle da podridão branca. GLADDERS *et al.* (1988) relataram que procymidone controlou a doença e aumentou a produção de cebola de 1,3-2,4 ton/ha para 28,1-30,2 ton/ha, em dois anos sucessivos, quando aplicados em pré-plantio. PORTER *et al.* (1991) demonstraram a eficácia de procymidone em reduzir a incidência da doença e aumentar a produção de cebola quando aplicado em tratamento

de sementes (25 g i.a./kg de semente), aliado a uma pulverização na superfície do solo (2,5 kg i.a./ha). O uso do mesmo produto, formulado em grânulos, aplicado na dosagem de 2,5 kg i.a./ha, também foi eficiente na redução da doença.

FULLERTON & STEWART (1991) compararam a eficiência de iprodione, vinclozoline e procymidone no controle da podridão branca em cebola e concluíram que tanto o iprodione quanto o vinclozoline não foram efetivos em tratamento de sementes, mesmo quando usados em combinação com pulverizações foliares. Procymidone, neste experimento, reduziu a incidência da doença quando usado em sementes (5,0 g i.a./kg de semente) e em pulverizações foliares mensais (0,75 kg i.a./ha, quatro aplicações). STEWART & FULLERTON (1991) testaram, ainda, vários métodos de aplicação do fungicidas procymidone. A aplicação do produto em tratamento de sementes seguida de pulverizações foliares (quatro, com intervalos de um mês) reduziu em 71-95% a incidência da doença. Quando aplicado uma única vez, na forma de grânulos na superfície do solo, houve uma redução na incidência de 89-95%. Uma formulação de liberação lenta, aplicada em tratamento de sementes, seguida de pulverizações foliares, reduziu em 85% a incidência da doença e ampliou o período de proteção durante os estágios iniciais da cultura.

O uso intensivo dos fungicidas do grupo das dicarboximidas tem possibilitado a observação de alguns fenômenos que podem afetar a eficiência destes produtos. Pesquisando o efeito do tratamento de sementes com iprodione e vinclozoline sobre a planta de cebola, WICKS & PHILP (1985) verificaram que esses fungicidas, aplicados a 100 g i.a./kg de semente, reduziram a germinação das sementes em pelo menos 40%, prejudicando também o crescimento das plântulas no campo, nas duas cultivares testadas. PORTER *et al.* (1991) relataram uma redução na emergência de plantas de 27% quando procymidone foi aplicado em tratamento de sementes (25 g i.a./kg de semente). STEWART & FULLERTON (1991) também relataram fitotoxidez em plantas jovens de cebola, causada pela aplicação de procymidone na superfície do solo.

COLEY-SMITH (1990) comenta que, nos últimos anos, a eficiência de fungicidas como iprodione e vinclozoline vem diminuindo, provavelmente devido a um aumento na degradação destes compostos nos solos onde vêm sendo continuamente aplicados, o que foi confirmado, recentemente, pelos trabalhos de FULLERTON & STEWART (1991) e SLADE *et al.* (1992). Segundo COLEY-SMITH (1990), caso um composto orgânico seja continuamente adicionado ao solo, é inevitável que espécies capazes de degradar este composto sejam estimuladas em sua atividade. As quantidades do produto aplicadas ao solo teriam, então, que ser consideravelmente maiores, o que poderia causar problemas de acúmulo do produto no solo e poluição do ambiente, além de prejudicar cultivos subseqüentes.

Não houve até o momento relatos de resistência de *S. cepivorum* a fungicidas no campo, mas o fungo tem, provavelmente, o potencial de desenvolver resistência a fungicidas como as dicarboximidas, já que, em laboratório, a resistência a iprodione e vinclozoline foi facilmente obtida (LITTLE & RAHE, 1984; COLEY-SMITH, 1990).

Outros produtos, além dos já citados, foram testados para o controle de *S. cepivorum*. ENTWISTLE & MARIAN (1983) mostraram que, com exceção de triadimefon, nenhum dos outros produtos (carboxin, oxycarboxyn e tolclofos-metil) mostrou eficiência adequada. Apesar de triadimefon ter reduzido a incidência da doença, a menor dose testada foi fitotóxica. Os autores ainda testaram tiabendazole, conseguindo apenas uma leve e temporária redução da infecção por *S. cepivorum*. CORBAZ & DORSAZ (1992) também relataram bons resultados no controle da doença em cebola com o uso de triadimefon a 0,1%. Os mesmos autores obtiveram resultados semelhantes com o produto cyproconazole, também a 0,1%, em canteiro.

Recentemente, produtos como diniconazole, tebuconazole e fluazinam foram relatados como sendo bastante eficientes no controle de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia minor*, todos fungos formadores de escleródios, e podem ser uma alternativa para o controle de *S. cepivorum*. BRENNEMAN *et al.* (1991) relataram que

tebuconazole foi bastante ativo contra *S. rolfii* e *R. solani* “in vitro”, em dosagens significativamente menores quando comparados a PCNB. CSINOS (1989) relatou que diniconazole, na dosagem de 0,28 kg i.a./ha, foi bem mais eficiente que PCNB, aplicado a 1,68-11,2 kg i.a./ha, no controle de *R. solani* em amendoim. Fluazinam limitou a ocorrência de *S. minor* no campo e aumentou a produção de amendoim, quando comparado com produtos do grupo das dicarboximidas (SMITH *et al.*, 1991).

2.2.2. Controle biológico

A inexistência de cultivares comerciais de cebola com resistência adequada à podridão branca, aliada ao fato dos fungicidas recomendados não alcançarem um controle total da doença, abrem espaço para o controle biológico como uma alternativa aos métodos de controle atualmente empregados (UTKHEDE & RAHE, 1980).

COOK & BAKER (1983) conceituam o controle biológico como a redução da quantidade de inóculo ou da atividade patogênica de um organismo através de outro(s) organismo(s) que não o homem. Esses autores consideram, ainda, que o controle biológico pode ser alcançado através de várias maneiras, tais como: práticas culturais que favoreçam o antagonista ou a resistência do hospedeiro; melhoramento genético de plantas que venha a aumentar a resistência da planta ao patógeno ou favorecer a adequação da planta às atividades do antagonista; introdução massal do antagonista, de linhagens não patogênicas ou de outros organismos ou agentes benéficos.

No caso de patógenos veiculados pelo solo, a atenção deve estar voltada para práticas agrícolas e para microrganismos que controlem o inóculo presente no solo, através da destruição de unidades propagativas ou da biomassa do patógeno, impedimento da formação do inóculo, desalojamento do patógeno de resíduos de cultura infestados ou da diminuição da patogenicidade e longevidade do patógeno (COOK & BAKER, 1983; HOMECHIN, 1991). A destruição das unidades propagativas do

patógeno é uma prática que deve ser aplicada para patógenos que vivem parte de seu ciclo vital no solo, sem a proteção do hospedeiro, estando, assim, vulneráveis ao ataque de predadores e hiperparasitas, como é o caso de *S. cepivorum* (HOMECHIN, 1991).

O fato de *S. cepivorum* não crescer saprofiticamente em solos não esterilizados sugere que a antibiose tenha um papel significativo no controle da doença (SCOTT, 1956). Muitos trabalhos foram feitos com o objetivo de encontrar bons antagonistas, capazes de controlar *S. cepivorum*. Os seguintes microrganismos foram citados como sendo antagônicos a *S. cepivorum*: *Bacillus subtilis* (UTKHEDE & RAHE, 1980, 1983a 1983b; MOUSA *et al.*, 1987; EL-RAZIK *et al.*, 1986); *Bacillus pumilus* (EL-RAZIK *et al.*, 1986); *Penicillium nigricans* (GHAFAR, 1969a; 1969b; UTKHEDE & RAHE, 1980); *Penicillium expansum* (HARRISON & STEWART, 1988); *Penicillium godlewskii* (EL-RAZIK *et al.*, 1986); *Aspergillus candidus* (EL-RAZIK *et al.*, 1986); *Trichoderma harzianum* (ABD-EL-MOITY & SHATLA, 1981; OLIVEIRA *et al.* 1984; EL-RAZIK *et al.*, 1986; MOUSA *et al.*, 1987); *Trichoderma viride* (HARRISON & STEWART, 1988).

Apesar da pesquisa sobre o uso de antagonistas no controle de *S. cepivorum* já vir sendo feita há mais de duas décadas, a maioria dos trabalhos ainda concentra-se na fase de “screening” de antagonistas e poucos são os resultados que comprovam a eficiência destes microrganismos no campo.

Os isolamentos de potenciais antagonistas de *S. cepivorum* foram feitos de várias maneiras: diluição seriada de amostras de solo infestado com o patógeno (GHAFAR, 1969a; OLIVEIRA *et al.*, 1984; WONG & HUGHES, 1986; HARRISON & STEWART, 1988); diluição de solo aderido a bulbos doentes (MOUBASHER *et al.*, 1970; JACKSON *et al.*, 1991); plaqueamento de suspensão de raízes de bulbos sem sintomas (OLIVEIRA *et al.*, 1984; WONG & HUGHES, 1986); isolamento de microrganismos associados à superfície de escleródios do patógeno (UTKHEDE & RAHE, 1980; WONG & HUGHES, 1986; JACKSON *et al.*, 1991).

O "screening" de fungos e bactérias visando avaliar o potencial destes microrganismos como antagonistas foi feito, em alguns casos, através de culturas pareadas, determinando-se a porcentagem de inibição do crescimento micelial do patógeno (GHAFFAR, 1969a) e o aparecimento de zonas de inibição (MOUBASHER *et al.*, 1970; UTKHEDE & RAHE, 1980; OLIVEIRA *et al.*, 1984; WONG & HUGHES, 1986; JACKSON *et al.*, 1991). OLIVEIRA *et al.* (1984) e JACKSON *et al.* (1991) identificaram antagonistas produtores de antibióticos, voláteis ou não, com efeito sobre o crescimento micelial e produção de escleródios de *S. cepivorum*. OLIVEIRA *et al.* (1984) observaram, ainda, as interações entre *S. cepivorum* e os fungos antagonistas através de microscopia ótica.

Em condições controladas, ABD-EL-MOITY & SHATLA (1981) conseguiram redução de 28 a 70% na incidência de podridão branca em cebola aplicando uma suspensão de *Trichoderma harzianum* na superfície do solo. OLIVEIRA *et al.* (1984) também trabalhando com *T. harzianum*, conseguiram 20,5% de aumento no número de plantas sadias. Ainda em condições controladas, GHAFFAR (1969a) obteve resultados promissores com aplicações de *Penicillium nigricans* em solo infestado artificialmente. UTKHEDE & RAHE (1980) relataram uma redução de 25% na incidência da podridão branca em cebola, em condições de casa-de-vegetação, com aplicação de caldo com *Bacillus subtilis* em tratamento de sementes. Os mesmos autores, posteriormente, aliaram este tratamento a uma aplicação de vinclozoline (0,02 g/vaso) no solo e conseguiram controlar totalmente a doença (UTKHEDE & RAHE, 1983b).

UTKHEDE & RAHE (1980; 1983a), em experimentos de campo, demonstraram a capacidade de quatro isolados de *B. subtilis* em proteger a cultura da cebola contra a podridão branca quando aplicados às sementes. O tratamento de sementes com estes isolados bacterianos não afetou o peso dos bulbos ou o número de folhas por planta (UTKHEDE & RAHE, 1983b). Os níveis de proteção oferecidos por alguns destes isolados foram comparáveis àqueles mostrados pelos tratamentos químicos com vinclozoline e iprodione. UTKHEDE & RAHE (1983a) obtiveram controle

satisfatório da doença em três anos consecutivos, quando combinaram o tratamento de sementes com *Bacillus* e aplicação de fungicida no solo. No entanto, Rahe¹, citado por COLEY-SMITH (1987) comenta que, embora resultados positivos tenham sido obtidos com o tratamento de sementes empregando *Bacillus* em dois anos consecutivos, este método falhou em dar proteção adequada nos dois anos seguintes.

Outro exemplo de experimentação feita no campo com o uso de antagonistas é o caso da aplicação de *Trichoderma harzianum* no Egito, para o controle da podridão branca da cebola. Em 1980-1981, a incidência da doença em parcelas tratadas com *T. harzianum* foi de 10-15%, comparada com 85% de doença em parcelas não tratadas. Em 1981-1982, mais de 100 hectares foram tratados com o antagonista, e o nível médio de controle foi de 82%, similar àquele conseguido com iprodione. Em 1982-1983, novamente foi feito o tratamento com o antagonista em mais de 100 hectare, com um controle de 87% (Abd-El-Moity², citado por COLEY-SMITH, 1987). ABD-EL-MOITY *et al.* (1982) selecionaram linhagens de *T. harzianum* resistentes a alguns fungicidas (iprodione, chlorotalonil, procymidone e vinclozoline). Em condições de campo, a combinação de iprodione com a linhagem de *T. harzianum* selecionada resultou em controle da doença superior ao tratamento que empregou o fungicida isoladamente.

COLEY-SMITH (1987) comenta, contudo, que apesar destes sucessos, altos níveis de infecção foram observados em alguns dos campos tratados com *T. harzianum*. Essas falhas foram atribuídas a vários fatores, tais como temperatura, tipo de solo, controle da irrigação ou altas populações de plantas daninhas. Este autor conclui, assim, que microrganismos antagônicos podem reduzir a incidência da podridão branca em certas condições, mas a natureza aleatória dos resultados obtidos sugere que muito mais pesquisa deve ser feita nesta área.

¹ Rahe, J.E. Biological Control. **Proceedings** of the Second International Workshop on *Allium* white rot. Beltsville, MD, p. 71-73, 1983.

² Abd-El-Moity, T.H. Biological control of white rot of onion in the field. **Proceedings** of the Second International Workshop on *Allium* white rot. Beltsville, MD, p. 81-82, 1983.

Há casos de microrganismos antagônicos que são conhecidos como micoparasitas de *S. cepivorum*, agindo sobre os escleródios deste patógeno. A literatura menciona diversas espécies: *Coniothyrium minitans* (AHMED & TRIBE, 1977; STEWART & HARRISON, 1988; HARRISON & STEWART, 1988); *Sporidesmium sclerotivorum* (Ayers & Adams¹, citados por COLEY-SMITH, 1987); *Gliocladium virens* e *Gliocladium roseum* (STEWART & HARRISON, 1988); *Chaetomium globosum* (STEWART & HARRISON, 1988).

Acredita-se que estes micoparasitas citados sejam mais agressivos que, por exemplo, espécies de *Trichoderma*, considerados micoparasitas passivos (ADAMS, 1990). *S. sclerotivorum* é citado como parasita obrigatório de escleródios de *Sclerotinia minor*, *S. sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, *Botrytis cinerea* e *Sclerotium cepivorum*. A interação *Sclerotinia minor* - *Sporidesmium sclerotivorum* já foi bem estudada e é sabido que o controle da doença em alface pode ser conseguido com 0,08 propágulos do antagonista por grama de solo (ADAMS, 1990).

AHMED & TRIBE (1977), trabalhando com cebola em condições controladas, conseguiram um controle significativo de *S. cepivorum* usando *C. minitans* em polvilhamento do solo e em tratamento de sementes. STEWART & HARRISON (1988) também observaram o micoparasitismo de *C. minitans* em escleródios de *S. cepivorum*. Estes autores também relataram o micoparasitismo de escleródios deste patógeno por *Gliocladium roseum*, *G. virens* e *Chaetomium globosum* “in vitro” e ponderam que a habilidade de colonizar os escleródios em cultura pode não refletir o que acontece no solo, com a presença de outros microrganismos e efeitos do ambiente (pH, temperatura, umidade), mas os resultados obtidos representam um indicativo para futuros estudos.

Com base no conceito amplo de controle biológico de COOK & BAKER (1983), pode-se considerar a solarização como uma prática de biocontrole, pois esta técnica favorece a ação de antagonistas através do enfraquecimento do patógeno por

¹ Ayers, W.A. & Adams, P.B. Mycoparasitism and its application to biological control of plant diseases. In: Papavizas, G.C. (ed.) **Biological Control in Crop Production**. Allanheld, NJ, p. 91-103, 1981.

temperaturas subletais (KATAN *et al.*, 1976). O método de aquecimento do solo utilizando cobertura plástica causa uma esterilização parcial do solo, e, dessa maneira, elimina ou reduz o inóculo do patógeno presente no solo (COLEY-SMITH, 1990). Reduções na população de escleródios de *S. cepivorum* com esta técnica foram obtidas na Austrália e Egito (Porter¹; El-Yamani *et al.*², citados por COLEY-SMITH, 1990). NUNES (1992) conseguiu também controle da doença em campos de cebola, na região de São José do Rio Pardo, utilizando a solarização por 30 dias. COLEY-SMITH (1990) é de opinião que este método tem, claramente, grande potencial para o controle da podridão branca em países com climas favoráveis, embora seu emprego seja, ainda, relativamente oneroso.

Outra prática que pode ser considerada como controle biológico, ou como fazendo parte de uma estratégia de biocontrole, é o uso de substâncias que estimulem a germinação do escleródio de *S. cepivorum*. Esta estratégia baseia-se no fato de os escleródios deste fungo germinarem em resposta a compostos (sulfóxidos alquil) que são liberados pelas raízes de plantas do gênero *Allium* (Schippers & Gams³, citados por HOMECHIN, 1991). MERRIMAN *et al.* (1980) foram os primeiros a testar esta abordagem e demonstraram que a aplicação de óleo de cebola no solo promove a germinação dos escleródios de *S. cepivorum*, com conseqüente aumento da suscetibilidade do fungo ao ataque de microrganismos. COLEY-SMITH (1990), ainda nesta linha, comenta que a substância dissulfeto dialílico é um estimulante ativo da germinação de escleródios, capaz de reduzir marcadamente as populações de escleródios no solo antes do plantio da cebola, o que resulta em redução da doença e, conseqüentemente, aumento da produção no campo.

¹ Porter, I.J. Soil solarization in Victoria for control of white rot in onions caused by *Sclerotium cepivorum*. In: **Proceedings** of the Second International Workshop on *Allium* white rot. Beltsville, p. 118-125, 1983.

² El-Yamani, T.; Abdel-Rahim, M.K.; Michael, K.Y.; Grinstein, A.; Katan, J. Soil solarization - a potential method for controlling white rot and other soilborne diseases in onions. In: **Proceedings** of the Second International Workshop on *Allium* white rot. Beltsville, p. 126, 1983.

³ Schippers, B. & Gams, W. **Soil-borne plant pathogens**. New York, Academic Press, 1979, 686p.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Experimentos “in vitro”

3.1.1. Obtenção de isolados de *Sclerotium cepivorum*

Foram obtidos três isolados de *S. cepivorum*, um deles proveniente de bulbo de alho doente e os outros dois provenientes de material de cebola doente e de solo contaminado da região de São José do Rio Pardo.

O isolado proveniente de alho, denominado SA, foi obtido através da transferência direta para ágar-água de escleródios presentes em material vegetal infectado, com prévia desinfecção superficial dos escleródios em solução aquosa de cloro ativo a 1,5% por 2-3 minutos. Ocorrida a germinação dos escleródios, o micélio foi transferido para BDA (batata-dextrose-ágar).

O isolado proveniente de cebola, denominado S3, foi cedido pela pesquisadora M.E.T. Nunes (UNESP/Ilha Solteira). O outro isolado, denominado A2, foi obtido a partir de solo contaminado proveniente de área de plantio de cebola, segundo a técnica descrita por UTHKEDE & RAHE (1979). Procedeu-se o peneiramento úmido de alíquotas de 30 g de solo, utilizando peneiras de 20, 40 e 80 mesh, sendo que somente o resíduo recolhido na peneira de 80 mesh foi utilizado. Lavou-se bem o resíduo na peneira em água corrente, transferindo-o então para proveta contendo 100 ml de solução aquosa de sacarose 2,5 M. A proveta foi agitada e em seguida aguardou-se a decantação das partículas por, no mínimo, duas horas. A fração que flutuou, contendo escleródios e outras partículas de tamanho e densidade semelhantes, foi retirada e lavada com água destilada em peneira para retirar a sacarose. A fração foi então distribuída sobre papel de

filtro, de modo a formar uma camada fina. Em seguida, sob microscópio estereoscópico, os escleródios foram separados dos outros resíduos com o auxílio de uma pinça.

Os escleródios foram desinfetados superficialmente com hipoclorito de sódio a 1,5% e transferidos para placas contendo BDA, tendo-se o cuidado de pressioná-los levemente com a pinça, antes da deposição no meio. O esmagamento dos escleródios faz com que a germinação dos mesmos seja mais rápida e uniforme, minimizando os problemas com contaminação, segundo COLEY-SMITH (1985). As placas foram mantidas a 20°C, no escuro, por 4 a 5 dias. Após o desenvolvimento das colônias, discos de micélio foram então transferidos para BDA, obtendo-se assim culturas puras do fungo.

3.1.2. Obtenção de isolados de antagonistas

Os isolados de microrganismos antagônicos foram obtidos de duas fontes: os escleródios de *S. cepivorum* e o solo. No primeiro caso, o isolamento de antagonistas a partir de escleródios do patógeno foi feito durante a recuperação de escleródios de amostras de solo naturalmente infestado, de acordo com o proposto por UTKHEDE & RAHE (1980). Foram utilizadas 10 amostras de solo onde havia sido plantada cebola, provenientes da região de São José do Rio Pardo.

Os escleródios foram recuperados através de peneiramento úmido e flutuação em sacarose e transferidos para meio de cultura, sem desinfecção superficial. Os meios utilizados foram meio de Martin, visando isolamento de fungos, e nutriente-ágar, visando o isolamento de bactérias. As placas foram mantidas a 20°C e observadas diariamente. Os microrganismos que apareceram ao redor dos escleródios ou sobre eles foram transferidos para BDA.

Outro método empregado para o isolamento de agentes microbianos com potencial para antagonismo foi a utilização de iscas para o isolamento a partir de solo contaminado. As iscas constituíram-se de sementes de trigo esterilizadas e colonizadas com o patógeno, colocadas em solo contido em placas de Petri, por 48 horas. A seguir as sementes foram retiradas, lavadas e plaqueadas em meio de Martin e nutriente-água (GHINI & KIMATI, 1989). As placas foram mantidas a 20°C e observadas diariamente para a presença de microrganismos. Os microrganismos que apareceram ao redor ou sobre as sementes foram transferidos para BDA.

O terceiro método utilizado para o isolamento de agentes microbianos foi a diluição de solo infestado pelo patógeno. Foram feitas diluições de duas amostras de solo provenientes de São José do Rio Pardo. Colocou-se 1 g de solo em 9 ml de água esterilizada e agitou-se por dez minutos. A partir desta suspensão 1:10 foram preparadas diluições seriadas, transferindo sempre 1 ml da diluição anterior para 9 ml de água esterilizada. As diluições finais (10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}) foram plaqueadas em meio de Martin e nutriente-água, visando o isolamento de fungos e bactérias, respectivamente. As placas foram mantidas a 20°C e observadas diariamente. Os microrganismos que apareceram foram transferidos para BDA.

3.1.3. Testes com fungicidas

Foram realizados três ensaios “in vitro” com fungicidas, com o objetivo de verificar a ação destes produtos sobre o crescimento de *S. cepivorum*.

Os meios de cultura com os fungicidas foram preparados segundo técnica citada por FANCELLI (1987), que consiste em dissolver quantidade adequada do produto em solução de 90 ml de água destilada estéril e 10 ml de álcool. Desta suspensão estoque são feitas diluições em série, obtendo-se as concentrações desejadas e adicionando-se 1

ml de cada suspensão a 99 ml do meio de cultura (no presente estudo, BDA) a uma temperatura de 45 a 50°C.

O inóculo empregado nos testes foi constituído de discos (0,5 cm de diâmetro) de meio de cultura com micélio do patógeno retirados de colônias com 5 dias de idade, incubadas a 20°C, e colocados no centro de placas contendo BDA mais fungicida. As placas foram mantidas no escuro, também a 20°C.

O primeiro teste foi feito com os seguintes produtos: PCNB (PECENOL PM), captan (CAPTAN 750 TS), iprodione (ROVRAL), vinclozoline (RONILAN 500), benomyl (BENLATE), tebuconazole (FOLICUR CE), diniconazole (DINICONAZOLE S33081 5EC) e procymidone (SUMILEX), nas dosagens de 0, 1, 10 e 100 ppm, em quatro repetições. O isolado A2 de *S. cepivorum* foi utilizado neste ensaio.

O segundo experimento foi feito com quatro produtos, selecionados do teste anterior: vinclozoline (RONILAN 500), procymidone (SUMILEX), tebuconazole (FOLICUR CE) e diniconazole (DINICONAZOLE S33081 5EC). Neste segundo teste, dosagens menores (0,1 e 0,5 ppm) foram utilizadas, com o objetivo de evidenciar a eficiência de cada produto. O teste foi feito com os três isolados de *S. cepivorum* disponíveis (A2, S3 e SA), com três repetições.

O terceiro ensaio foi realizado para testar dois fungicidas, fluazinam (FROWNCIDE) e triadimefon (BAYLETON), que não haviam sido testados previamente “in vitro” e que participaram do experimento “in vivo” de controle químico, devido aos resultados promissores relatados na literatura recente. Os outros produtos empregados neste ensaio foram vinclozoline (RONILAN 500), procymidone (SUMILEX), tebuconazole (FOLICUR PM) e diniconazole (SPOTLESS). O isolado A2 de *S. cepivorum* foi cultivado em BDA contendo os fungicidas nas concentrações de 0, 0,1, 0,25 e 0,5 ppm, em quatro repetições.

Em todos os ensaios as avaliações consistiram na medição diária dos diâmetros das colônias, em dois sentidos perpendiculares entre si, até a testemunha (0 ppm) atingir

os bordos da placa. Com estes dados, obteve-se a porcentagem de inibição do crescimento micelial de *S. cepivorum*, ED50 e MIC. O ED50 foi obtido pela determinação da dosagem do fungicida que inibiu 50% do crescimento do patógeno, em relação à testemunha sem fungicida. O MIC (mínima concentração inibitória) foi obtido pela observação da dosagem mínima testada que inibiu totalmente o crescimento do patógeno por 7 dias.

3.1.4 Testes com antagonistas

Os testes de antagonismo “in vitro” tiveram o objetivo de selecionar potenciais antagonistas entre os isolados obtidos, com base na capacidade de interferência do microrganismo no desenvolvimento do patógeno.

O método utilizado foi a cultura pareada em BDA, que consiste na transferência do patógeno e do possível antagonista para extremidades opostas da mesma placa. O patógeno (isolado A2) foi transferido na forma de discos de 5 mm de diâmetro de colônias com crescimento ativo, um dia antes da inoculação do potencial antagonista. No caso dos testes com os isolados fúngicos, os microrganismos foram transferidos na forma de discos de colônias com 5 mm de diâmetro. Quanto aos isolados bacterianos, estes foram transferidos através de alça de platina, em inoculação puntiforme.

As placas foram mantidas a 20°C, no escuro. As testemunhas utilizadas foram placas somente com o patógeno, em uma das extremidades. A avaliação foi feita cinco a seis dias após a inoculação com o patógeno e consistiu na determinação do raio da colônia de *S. cepivorum*, medido a partir do centro do disco de inoculação. A presença de halo inibitório e a inibição da formação de escleródios também foram observadas. A porcentagem de inibição do crescimento de *S. cepivorum* foi obtida a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = ((\text{cresc. test.} - \text{cresc. trat.}) / \text{cresc. test.}) \times 100$$

onde *cresc. test.* é o raio da colônia de *S. cepivorum* nas placas testemunha e *cresc. trat.* é o raio da colônia de *S. cepivorum* frente aos isolados antagonísticos.

Primeiramente, todos os isolados obtidos foram testados em diversas baterias de testes. Com base nos resultados preliminares obtidos, foram selecionados alguns isolados para novo teste, visando confirmar os resultados. Os critérios utilizados para a seleção dos isolados fúngicos foram: a) porcentagem de inibição do crescimento de *S. cepivorum* maior que 70% e b) inibição da formação de escleródios na colônia do patógeno. Os isolados bacterianos selecionados para o novo teste foram aqueles que levaram à formação de um halo de inibição, paralisando o crescimento da colônia do patógeno.

Na repetição dos testes de antagonismo com os isolados selecionados, o patógeno foi colocado nas placas dois dias antes dos antagonistas. Os isolados que mostraram reação diferente daquela do teste preliminar foram descartados. Nesta fase, foram selecionados aqueles isolados fúngicos que confirmaram a capacidade de inibir o crescimento micelial do patógeno (porcentagem de inibição superior a 40%) e que inibiram a formação de escleródios na colônia do patógeno. Os isolados bacterianos selecionados foram aqueles que formaram halo de inibição, confirmando o resultado do teste preliminar.

3.2. Experimentos “in vivo”

3.2.1. Métodos de inoculação

Este ensaio foi idealizado com o objetivo de ajustar a metodologia utilizada para os experimentos seguintes de controle químico e biológico. O experimento teve dois fatores envolvidos: substrato e métodos de inoculação. Dois substratos diferentes foram utilizados: um substrato composto (solo, esterco e areia na proporção 1,5:1:1), que foi autoclavado, e um solo natural, não autoclavado. A inoculação foi feita com escleródios ou com micélio de *S. cepivorum*.

O ensaio foi realizado em câmaras de crescimento com controle de temperatura e fotoperíodo. Com base nos dados da literatura, o experimento foi conduzido a 16°C. O fotoperíodo foi de 12 horas luz/12 horas de escuro.

As parcelas foram constituídas de copos plásticos com capacidade de 400 ml preenchidos com solo (autoclavado ou natural), para onde foram transplantadas 10 mudas de cebola da variedade Pira Ouro, cultivadas em condições de casa-de-vegetação e transplantadas para os copos com quatro semanas de idade (ADAMS & PAPAVIZAS, 1971).

Uma semana após o transplante, as parcelas foram observadas e as plantas que não resistiram ao transplante foram substituídas.

Os tratamentos foram os seguintes, em quatro repetições:

1. Testemunha não inoculada, em solo autoclavado.
2. Testemunha não inoculada, em solo não autoclavado.
3. Inoculação com escleródios de *S. cepivorum*, em solo autoclavado.
4. Inoculação com escleródios, em solo não autoclavado.

5. Inoculação com escleródios + 50 ml de solução de glicose 0,5%, em solo autoclavado.

6. Inoculação com escleródios + 50 ml de solução de glicose 0,5%, em solo não autoclavado.

7. Inoculação com suspensão de micélio (10 dias de idade), em solo autoclavado.

8. Inoculação com suspensão de micélio (10 dias de idade), em solo não autoclavado.

9. Inoculação com suspensão de micélio (15 dias de idade), em solo autoclavado.

10. Inoculação com suspensão de micélio (15 dias de idade), em solo não autoclavado.

A inoculação com escleródios foi feita na superfície, colocando-se em cada parcela 25 ml de inóculo, que consistiu de solo peneirado (autoclavado ou não, conforme o tratamento) e 1.000 escleródios do isolado A2 (produzidos em trigo autoclavado, previamente enterrados por um mês para quebra de dormência constitutiva), formando uma camada de um centímetro de espessura na superfície da parcela. Nos tratamentos não inoculados com escleródios foi colocado apenas solo peneirado. Os escleródios foram colocados apenas na superfície (primeiros dois centímetros), com base no trabalho de MERRIMAN *et al.* (1981), que concluíram que os escleródios situados nesta profundidade determinam a maior ocorrência da doença. A adição de solução de glicose a 0,5%, nos tratamentos 5 e 6, foi feita com base no estudo de ELNAGHY *et al.* (1971), que evidencia a ação estimulante da fração de açúcares do extrato de cebola sobre a germinação de escleródios de *S. cepivorum*.

A inoculação com micélio foi feita colocando-se 50 ml de inóculo que consistiu de uma suspensão de micélio, feita com a trituração de BDA com crescimento micelial

de *S. cepivorum* (isolado A2) com 10 e 15 dias de idade. Duas placas de BDA com micélio de cada idade foram trituradas com 200 ml de água destilada. As parcelas não inoculadas com suspensão de micélio foram regadas com 50 ml de água destilada.

A umidade do solo foi mantida aproximadamente a 40% da capacidade de campo dos solos utilizados, colocando-se 40 ml de água por parcela a cada dois dias.

Foram feitas avaliações semanais a partir dos 30 dias da montagem do experimento, quando apareceram as primeiras plantas com sintomas da doença. A avaliação final foi feita 12 semanas após o transplante das mudas, determinando-se a porcentagem de sobrevivência e o peso da parte aérea das plantas de cada parcela.

3.2.2. Controle químico

Este ensaio foi realizado em câmara de crescimento com o objetivo de verificar a eficiência de produtos previamente testados “in vitro” no controle da podridão branca da cebola. As condições ambientais foram as mesmas do ensaio anterior em câmara de crescimento (16°C; 12h luz/12h escuro; umidade do solo próxima de 40% da capacidade de campo).

As parcelas foram constituídas de copos plásticos com capacidade de 400 ml, preenchidos com solo natural, não autoclavado. Adicionou-se ao solo que serviu para o preenchimento dos copos areia lavada, na proporção de um terço do volume, com o objetivo de melhorar a drenagem do solo. Dez mudas de cebola da variedade Pira Ouro, com quatro semanas de idade, foram transplantadas para cada parcela.

O inóculo foi preparado da mesma forma do ensaio sobre métodos de inoculação (item 3.4), ou seja, 25 ml de solo peneirado por parcela com 1.000 escleródios (produzidos em trigo autoclavado e previamente enterrados para a quebra da

dormência constitutiva). O inóculo foi colocado na superfície do solo, nas parcelas, formando uma camada de um centímetro de espessura.

Os tratamentos foram os seguintes, em três repetições:

1. Testemunha não inoculada, regada com água
2. Testemunha inoculada, regada com água
3. Rega com 50 ml de suspensão de procymidone (SUMILEX), a 0,12%
4. Rega com 50 ml de suspensão de procymidone (SUMILEX), a 0,05%
5. Rega com 50 ml de suspensão de vinclozoline (RONILAN), a 0,12%
6. Rega com 50 ml de suspensão de vinclozoline (RONILAN), a 0,05%
7. Rega com 50 ml de suspensão de diniconazole (SPOTLESS), a 0,023%
8. Rega com 50 ml de suspensão de diniconazole (SPOTLESS), a 0,004%
9. Rega com 50 ml de suspensão de triadimefon (BAYLETON), a 0,023%
10. Rega com 50 ml de suspensão de triadimefon (BAYLETON), a 0,004%
11. Rega com 50 ml de suspensão de fluazinam (FROWNCIDE), a 0,023%
12. Rega com 50 ml de suspensão de fluazinam (FROWNCIDE), a 0,004%
13. Rega com 50 ml de suspensão de tebuconazole (FOLICUR), a 0,023%
14. Rega com 50 ml de suspensão de tebuconazole (FOLICUR), a 0,004%

As regas com fungicida foram feitas na hora do transplante das mudas para as parcelas.

Foram feitas avaliações semanais a partir dos 30 dias da montagem do experimento, quando apareceram as primeiras plantas com sintomas da doença. A avaliação final foi feita 12 semanas após o transplante das mudas, determinando-se a porcentagem de sobrevivência e o peso da parte aérea das plantas em cada parcela.

3.2.3. Controle biológico

Este ensaio teve o objetivo de verificar a ação de agentes microbianos aplicados ao solo sobre o desenvolvimento da podridão branca em plantas de cebola. A metodologia utilizada neste ensaio foi a mesma do experimento com fungicidas em câmara de crescimento (item 3.2.2), só havendo diferenças nos tratamentos.

Os testes de antagonismo “in vitro” permitiram a seleção de 19 isolados de agentes microbianos (10 bactérias e 9 fungos) com potencial antagonístico a *S. cepivorum*. Como não se dispunha de espaço em câmara de crescimento para testar os 19 isolados ao mesmo tempo, optou-se por testar três isolados bacterianos e três fúngicos, escolhidos ao acaso.

Os microrganismos foram cultivados em caldo de cultura BD (batata-dextrose). Erlenmeyers contendo 150 ml de BD foram inoculados com discos de 5 mm de colônias de fungo/bactéria com dois dias de idade. Os erlenmeyers com bactéria foram mantidos em agitação constante, por 6 dias (UTKHEDE & RAHE, 1980). Os erlenmeyers inoculados com os fungos ficaram dois dias sem agitar, um dia em agitação e mais três dias sem agitar. Os frascos inoculados foram mantidos à temperatura ambiente. Após seis dias, foi feita a diluição dos caldos de cultura, adicionando-se 150 ml de água a cada erlenmeyer. Os caldos de cultura contendo os isolados fúngicos foram triturados no liquidificador.

Os tratamentos consistiram em regar as parcelas com 50 ml de caldo inoculado, fazendo uma ou duas aplicações.

Os tratamentos foram os seguintes, em três repetições:

1. Testemunha não inoculada, regada com água
2. Testemunha inoculada, regada com água

3. Rega com 50 ml de caldo com o isolado bacteriano 6A1 (uma aplicação)
4. Rega com 50 ml de caldo com o isolado bacteriano 6A1 (duas aplicações)
5. Rega com 50 ml de caldo com o isolado bacteriano 5B3 (uma aplicação)
6. Rega com 50 ml de caldo com o isolado bacteriano 5B3 (duas aplicações)
7. Rega com 50 ml de caldo com o isolado bacteriano 3B1 (uma aplicação)
8. Rega com 50 ml de caldo com o isolado bacteriano 3B1 (duas aplicações)
9. Rega com 50 ml de caldo com o isolado fúngico b35 (uma aplicação)
10. Rega com 50 ml de caldo com o isolado fúngico b35 (duas aplicações)
11. Rega com 50 ml de caldo com o isolado fúngico b4 (uma aplicação)
12. Rega com 50 ml de caldo com o isolado fúngico b4 (duas aplicações)
13. Rega com 50 ml de caldo com o isolado fúngico a12 (uma aplicação)
14. Rega com 50 ml de caldo com o isolado fúngico a12 (duas aplicações)

A primeira aplicação do caldo com o microrganismo foi feita na hora do transplante das mudas para as parcelas. Nos tratamentos onde foi realizada uma segunda aplicação, esta foi feita 30 dias após a primeira.

Foram feitas avaliações semanais a partir dos 30 dias da montagem do experimento, quando apareceram as primeiras plantas com sintomas da doença. A avaliação final foi feita 12 semanas após o transplante das mudas, determinando-se a porcentagem de sobrevivência e o peso da parte aérea das plantas em cada parcela.

4. RESULTADOS

4.1. Experimentos “in vitro”

4.1.1. Testes com fungicidas

A Tabela 1 apresenta os resultados do primeiro teste de inibição da atividade de *S. cepivorum* “in vitro”, expressos em termos de porcentagem de inibição, ED 50 e MIC. Os produtos vinclozoline, procymidone, tebuconazole e diniconazole apresentaram alta toxidez ao fungo, inibindo totalmente seu crescimento micelial a 1 ppm. Estes quatro produtos que tiveram melhor desempenho no primeiro teste foram, então, levados a novos testes.

Os resultados do segundo teste, feito com três isolados (A2, SA e S3) de *S. cepivorum*, estão, nas Tabelas 2 e 3 e na Figura 1 e mostram que os produtos testados inibem o crescimento micelial dos isolados A2, SA e S3, mesmo em concentrações baixas.

Os isolados de *Sclerotium cepivorum* tiveram pequenas diferenças de comportamento frente às duas concentrações dos fungicidas. Na concentração 0,1 ppm, o isolado A2 comportou-se como mais sensível aos fungicidas, considerando-se a inibição do crescimento micelial, seguido do isolados SA e S3. Já na concentração de 0,5 ppm, os isolados A2 e S3 mostraram maior sensibilidade aos produtos que o isolado SA. De modo geral, o tebuconazole foi o produto mais eficiente em inibir o crescimento dos três isolados do patógeno, e o procymidone, o menos eficiente.

A Tabela 4 apresenta os resultados do terceiro teste com fungicidas “in vitro”. Os produtos já testados anteriormente (procymidone, tebuconazole, vinclozoline e

diniconazole) comportaram-se de forma semelhante ao segundo teste, com relação à inibição do crescimento micelial do patógeno. O triadimefon, incluído neste teste, foi pouco eficiente em inibir o crescimento do fungo nas dosagens testadas, quando comparado aos outros produtos. Já o outro produto incluído, fluazinam, apresentou alta toxidez ao patógeno a baixas dosagens.

Tabela 1 - Efeito de diferentes dosagens de oito fungicidas no crescimento micelial de *Sclerotium cepivorum* (isolado A2)

Fungicida	% inibição na concentração (ppm) ⁽¹⁾			ED50	MIC
	1	10	100		
Captan	23,9 c	70,3 b	86,2 b	>1 e <10	>100
PCNB	81,6 b	100,0 a	100,0 a	<1	10
Iprodione	83,1 b	100,0 a	100,0 a	<1	10
Vinclozoline	100,0 a	100,0 a	100,0 a	<1	<1
Procymidone	100,0 a	100,0 a	100,0 a	<1	<1
Tebuconazole	100,0 a	100,0 a	100,0 a	<1	<1
Benomyl	75,5 b	100,0 a	100,0 a	<1	10
Diniconazole	100,0 a	100,0 a	100,0 a	<1	<1

(1) Em relação à testemunha (0 ppm); média de 4 repetições; médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem ao nível de 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey.

4.1.2. Obtenção de isolados de antagonistas de *Sclerotium cepivorum*

Foram obtidas 11 culturas fúngicas e 24 culturas bacterianas a partir do plaqueamento de escleródios do patógeno. O método de iscas permitiu o isolamento de

30 culturas fúngicas e 16 culturas bacterianas. Através da diluição em série de solos contaminados foram obtidas 26 culturas fúngicas e 21 culturas bacterianas.

Tabela 2 - Efeito da dosagem de 0,1 ppm de quatro fungicidas no crescimento micelial de três isolados de *Sclerotium cepivorum*

Fungicida	% inibição do isolado ⁽¹⁾		
	A2	SA	S3
Vinclozoline	71,3 bA	70,9 bA	60,4 bB
Diniconazole	89,8 aA	78,7 aB	91,1 aA
Tebuconazole	90,6 aA	83,1 aB	91,1 aA
Procymidone	58,2 cB	68,6 bA	22,8 cC

(1) Em relação à testemunha (0 ppm); média de 3 repetições; médias seguidas por letras minúsculas distintas nas colunas diferem entre si ao nível de 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey; médias seguidas por letras maiúsculas distintas nas linhas diferem entre si ao nível de 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey.

Tabela 3 - Efeito da dosagem de 0,5 ppm de quatro fungicidas no crescimento micelial de três isolados de *Sclerotium cepivorum*

Fungicida	% inibição do isolado ⁽¹⁾		
	A2	SA	S3
Vinclozoline	100,0 aA	90,5 bB	100,0 aA
Diniconazole	91,3 bB	74,8 cC	100,0 aA
Tebuconazole	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA
Procymidone	91,1 bA	86,6 bB	86,3 bB

(1) Em relação à testemunha (0 ppm); média de 3 repetições; médias seguidas por letras minúsculas distintas nas colunas diferem entre si ao nível de 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey; médias seguidas por letras maiúsculas distintas nas linhas diferem entre si ao nível de 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey.

Figura 1 - Efeito de duas dosagens de diferentes fungicidas no crescimento micelial "in vitro" de três isolados de *Sclerotium cepivorum* (A2, SA e S3). Legenda para os tratamentos: vinc=vinclozoline, dini=diniconazole, tebu=tebuconazole, proc=procymidone e A2, SA e S3=diferentes isolados do patógeno.

Tabela 4 - Efeito de diferentes dosagens de seis fungicidas no crescimento micelial de *Sclerotium cepivorum* (isolado A2)

Fungicida	% inibição na concentração (ppm) ⁽¹⁾			ED50
	0,10	0,25	0,50	
Vinclozoline	72,6 a	81,8 ab	89,6 ab	< 0,1
Diniconazole	85,4 a	91,3 a	91,6 ab	< 0,1
Tebuconazole	76,3 a	86,8 ab	97,2 a	< 0,1
Procymidone	51,4 b	75,6 b	84,7 b	< ou = 0,1
Triadimefon	32,7 c	40,6 c	64,3 c	0,25< ; <0,5
Fluazinam	83,4 a	87,1 ab	91,3 ab	< 0,1

(1) Em relação à testemunha (0 ppm); média de 4 repetições; médias seguidas de letras distintas nas colunas diferem entre si ao nível de 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey.

4.1.3. Testes com antagonistas

Os testes preliminares de antagonismo, feitos com todos os microrganismos obtidos, tornaram possível a comparação entre os métodos de isolamento quanto à eficiência em resgatar potenciais antagonistas do solo, sendo que os resultados obtidos, considerando os critérios utilizados para selecionar fungos e bactérias (item 3.1.4), estão, respectivamente, nas Tabelas 5 e 6. Observa-se que o isolamento de microrganismos da superfície dos escleródios foi o método mais eficiente na recuperação de potenciais antagonistas a *S. cepivorum*, de acordo com os parâmetros considerados. Sete isolados fúngicos (63,6%) obtidos por este método inibiram a formação de escleródios, enquanto dez isolados (33,3%) obtidos por isca e dois (7,7%) obtidos a partir de diluição do solo

tiveram o mesmo efeito. A inibição da formação de escleródios na colônia de *S. cepivorum* é considerada por JACKSON *et al.* (1991) como uma importante característica para a seleção de potenciais antagonistas a este patógeno.

Tabela 5 - Efeito de diferentes métodos de isolamento na obtenção de fungos antagonísticos a *Sclerotium cepivorum* e sobre a eficiência destes em inibir o crescimento micelial e a produção de escleródios pelo patógeno

Método de isolamento	Número de isolados obtidos	Inibição do crescimento ⁽¹⁾	Inibição de escleródios ⁽²⁾
Escleródios	11	7	7
Isca	30	18	10
Diluição do solo	26	5	2

(1) Número de isolados que mostraram porcentagem de inibição de *S. cepivorum*, em cultura pareada, igual ou superior a 70%.

(2) Número de isolados que inibiram a formação de escleródios na colônia do patógeno.

Tabela 6 - Efeito de diferentes métodos de isolamento na obtenção de bactérias antagonísticas a *Sclerotium cepivorum* e sobre a eficiência destas em induzir a formação de halos

Método de isolamento	Número de isolados obtidos	Formação de halo ⁽¹⁾
Escleródio	24	9
Isca	16	3
Diluição do solo	21	6

(1) Número de isolados que paralisaram o crescimento do patógeno, formando um halo de inibição.

Quanto à inibição do crescimento micelial do patógeno, os dois primeiros métodos (escleródio e isca) tiveram praticamente a mesma eficiência: 63,6% dos isolados do primeiro método e 60,0% dos isolados obtidos pelo segundo método inibiram o crescimento do patógeno em pelo menos 70%, com relação à testemunha. Entre os isolados obtidos a partir da diluição do solo, apenas 19,2% apresentaram este comportamento frente ao patógeno.

Considerando o critério utilizado para a seleção dos isolados bacterianos, 37,5% daqueles obtidos a partir da superfície dos escleródios manifestaram halo de inibição frente ao patógeno, contra 18,7% dos isolados obtidos a partir de isca e 28,5% dos isolados obtidos através de diluição do solo.

Nas Tabelas 7 e 8 estão os resultados dos testes de antagonismo feitos com os isolados selecionados dos testes preliminares, segundo os critérios já descritos (item 3.1.4). Foram selecionados 9 isolados fúngicos e 10 isolados bacterianos. Os isolados fúngicos a2, a12, b6 e b22 pertencem ao gênero *Penicillium* e os demais isolados, b4, b17, b21, b35 e b36 pertencem ao gênero *Trichoderma*. Os isolados bacterianos não foram identificados.

Os isolados de *Penicillium* spp. não tiveram a porcentagem de inibição determinada, já que não foi possível medir o raio das colônias, pois elas não apresentavam crescimento radial. Quatro isolados de *Penicillium* spp. (a2, a12, b6 e b22) foram selecionados por ocuparem mais de 70% da placa e inibirem a formação de escleródios na colônia do patógeno.

Tabela 7 - Efeito de isolados de fungos, obtidos por diferentes métodos de isolamento, sobre o crescimento micelial e a formação de escleródios por *Sclerotium cepivorum*

Isolados	Método de Isolamento	% inibição ⁽¹⁾	Formação de escleródios ⁽³⁾
a2 (<i>Penicillium</i> sp.)	escleródio	* ⁽²⁾	-
a12 (<i>Penicillium</i> sp.)	escleródio	*	-
b4 (<i>Trichoderma</i> sp.)	isca	61,97	-
b6 (<i>Penicillium</i> sp.)	isca	*	-
b17 (<i>Trichoderma</i> sp.)	isca	64,36	-
b21 (<i>Trichoderma</i> sp.)	isca	62,67	-
b22 (<i>Penicillium</i> sp.)	isca	*	-
b35 (<i>Trichoderma</i> sp.)	isca	57,74	-
b36 (<i>Trichoderma</i> sp.)	isca	40,84	-

(1) % inibição=((*cresc. test.* - *cresc. trat.*)/*cresc. test.*) x 100.

(2) Isolados de *Penicillium* sp. (sem crescimento radial) que ocuparam 70% ou mais da placa.

(3) (-)=inibição da formação de escleródios; (+)=formação de escleródios na colônia do patógeno.

4.2. Experimentos “in vivo”

4.2.1. Métodos de inoculação

A porcentagem de sobrevivência e o peso da parte aérea de cada parcela foram determinados neste ensaio e estão na Tabela 9. Observa-se, através destes dados, ilustrados nas Figuras 2 e 3, que tanto no solo autoclavado como no natural, não

Tabela 8 - Efeito de isolados de bactérias, obtidos por diferentes métodos de isolamento, sobre a indução de halo de inibição e a formação de escleródios por *Sclerotium cepivorum*

Isolados	Método de isolamento	Halo (cm) ⁽¹⁾	Formação de escleródios ⁽²⁾
4A	isca	1,5	+
6A1	isca	1,0	+
3B1	escleródio	1,2	+
5B2	escleródio	1,2	+
5B3	escleródio	1,4	+
5B6	escleródio	1,5	+
10B	escleródio	1,3	+
8C	diluição do solo	1,5	+
9C	diluição do solo	1,1	+
24C	diluição do solo	0,9	+

(1) Halo medido da borda da colônia bacteriana até o início da zona de paralisação do crescimento do patógeno.

(2) (-)=inibição da formação dos escleródios; (+)= formação de escleródios na colônia do patógeno.

autoclavado, o método de inoculação mais bem sucedido, ou seja, que provocou o maior número de plantas mortas devido à podridão branca, foi a inoculação com escleródios. Este resultado confirma a eficiência da inoculação com escleródios produzidos em laboratório, usada em vários experimentos em condições controladas com esta doença (ADAMS & PAPAVIDAS, 1971; MERRIMAN *et al.*, 1981; UTKHEDE & RAHE, 1980).

Tabela 9 - Efeito de diferentes métodos de inoculação de *Sclerotium cepivorum* na sobrevivência e peso da parte aérea de plantas de cebola em condições de câmara de crescimento

Métodos de inoculação	% sobrevivência ⁽¹⁾		Peso da parcela (g) ⁽²⁾	
	Solo autoclavado	Solo natural	Solo autoclavado	Solo natural
Sem inóculo	92,5 ab A ⁽³⁾	100,0 a A	24,9 ab A	11,0 ab B
Escleródios	61,6 b A	47,3 c A	18,8 b A	4,7 b B
Escleródio+glicose	92,5 ab A	53,8 bc B	23,5 ab A	5,3 b B
Micélio (10 dias)	97,4 a A	87,7 ab A	25,4 ab A	7,7 ab B
Micélio (15 dias)	99,3 a A	99,3 a A	28,4 a A	13,1 a B

(1) Em relação ao número inicial de plantas na parcela (10); média de quatro repetições.

(2) Peso da parte aérea de cada parcela, em gramas.

(3) Médias seguidas por letras minúsculas distintas (nas colunas) diferem entre si ao nível de 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey; médias seguidas por letras maiúsculas distintas (nas linhas, para cada variável) diferem entre si ao nível de 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey.

A variável peso da parte aérea das parcelas confirma a inoculação com escleródios como sendo o método mais eficiente para provocar a ocorrência da doença em mudas de cebola.

Figura 2 - Sobrevivência de plantas de cebola em função do método de inoculação com *Sclerotium cepivorum*: testemunha (test), escleródios (esc), escleródios e glicose (escg), micélio com 10 dias de idade (mic10) e micélio com 15 dias de idade (mic15).

Figura 3 - Peso da parte aérea de plantas de cebola em função do método de inoculação com *Sclerotium cepivorum*: testemunha (test), escleródios (esc), escleródios e glicose (escg), micélio com 10 dias de idade (mic10) e micélio com 15 dias de idade (mic15).

4.2.2. Controle químico

A Tabela 10 e a Figura 4 apresentam os resultados da avaliação dos fungicidas no controle da podridão branca, em condições de câmara de crescimento.

Tabela 10- Efeito de diferentes fungicidas “in vivo” (câmara de crescimento) no controle da podridão branca da cebola

Tratamento	% sobrevivência ⁽¹⁾	Peso da parcela (g) ⁽²⁾
Testemunha não inoculada	98,8 ab ⁽³⁾	7,4 cde
Testemunha inoculada	25,4 c	3,1 efgh
Procymidone 0,12%	100,0 a	13,6 ab
Procymidone 0,05%	100,0 a	16,3 a
Vinclozoline 0,12%	97,6 ab	8,2 cd
Vinclozoline 0,05%	70,0 bc	6,5 cdef
Diniconazole 0,023%	36,1 c	1,3 h
Diniconazole 0,004%	53,3 c	2,4 fgh
Triadimefon 0,023%	36,4 c	2,1 gh
Triadimefon 0,004%	95,5 ab	8,0 cd
Fluazinam 0,023%	97,6 ab	10,7 bc
Fluazinam 0,004%	95,5 ab	8,7 cd
Tebuconazole 0,023%	95,5 ab	6,3 defg
Tebuconazole 0,004%	100,0 a	10,2 bcd

(1) Em relação ao número inicial de plantas na parcela (10); média de três repetições.

(2) Peso da parte aérea das plantas de cada parcela.

(3) Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey.

Figura 4 - Efeito "in vivo" (câmara de crescimento) de duas dosagens de diferentes fungicidas no controle da podridão branca da cebola. Legenda para os tratamentos: testni=testemunha não inoculada, testi=testemunha inoculada, proc=procymidone, vinc=vinclozoline, dini=diniconazole, tria=triadimefon, flua=fluazinam e tebu=tebuconazole. Os algarismos 1 e 2 identificam a maior e menor dosagem, respectivamente.

Os produtos procymidone, tebuconazole e fluazinam controlaram totalmente a doença, nas duas dosagens testadas. O procymidone parece ter tido, também, um efeito fitotônico nas dosagens utilizadas, pois o peso das partes aéreas das parcelas tratadas com este produto foi significativamente maior que o peso da testemunha sem doença.

Fluazinam e tebuconazole não haviam ainda sido testados para o controle desta doença e mostraram-se promissores. A maior dosagem empregada de tebuconazole foi levemente fitotóxica, o que pode ser notado pela pequena redução do peso da parte aérea, em comparação à testemunha não inoculada.

O vinclozoline ofereceu bom controle da doença na maior dosagem testada. Seu desempenho não foi tão bom na dosagem mais baixa, mas ainda houve algum controle.

O triadimefon controlou bem a doença na dosagem mais baixa; a maior dosagem utilizada deste produto provocou fitotoxidez acentuada, com reflexos na sobrevivência de plantas e no peso das parcelas.

Deve-se notar que as dosagens de procymidone que controlaram eficientemente a doença são muito mais elevadas (2 a 30 vezes) que as dosagens empregadas de triadimefon, tebuconazole e fluazinam, o que mostra as possibilidades destes últimos produtos no controle da podridão branca da cebola.

4.2.3. Controle biológico

A Tabela 11 e a Figura 5 apresentam os resultados da avaliação de antagonistas de *S. cepivorum* no controle da podridão branca da cebola, em condições de câmara de crescimento. Os resultados mostram que houve poucas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos deste experimento.

O tratamento feito com duas aplicações de caldo com a bactéria 6A1 não diferiu da testemunha não inoculada, controlando parcialmente a ocorrência da doença. Apesar

Tabela 11 - Efeito “in vivo” (câmara de crescimento) de diferentes antagonistas de *Sclerotium cepivorum* no controle da podridão branca da cebola

Tratamento	% sobrevivência ⁽¹⁾	Peso da parcela (g) ⁽²⁾
Testemunha não inoculada	100,0 a ⁽³⁾	7,6 a
Testemunha inoculada	29,6 b	2,9 b
6A1, uma aplicação	53,5 b	4,5 ab
6A1, duas aplicações	68,4 ab	3,9 b
5B3, uma aplicação	50,1 b	3,1 b
5B3, duas aplicações	39,3 b	2,0 b
3B1, uma aplicação	40,0 b	2,7 b
3B1, duas aplicações	66,7 b	3,7 b
b35, uma aplicação	46,5 b	2,9 b
b35, duas aplicações	41,4 b	4,7 ab
b4, uma aplicação	63,5 b	3,8 b
b4, duas aplicações	49,8 b	3,9 b
a12, uma aplicação	39,3 b	3,2 b
a12, duas aplicações	39,8 b	3,8 b

(1) Em relação ao número inicial de plantas na parcela (10); média de três repetições.

(2) Peso da parte aérea das plantas de cada parcela.

(3) Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 1% de significância, de acordo com o teste de Tukey.

deste tratamento também não haver diferido dos demais, inclusive da testemunha inoculada, percebe-se uma tendência de redução da ocorrência da doença. Esta redução está expressa no aumento do estande das parcelas em 38,8 pontos percentuais neste tratamento, em relação à testemunha inoculada. O aumento na sobrevivência das plantas

Figura 5 - Efeito "in vivo" (câmara de crescimento) de antagonistas de *Sclerotium cepivorum* no controle da podridão branca da cebola. Legenda para os tratamentos: testni=testemunha não inoculada, testi=testemunha inoculada e as demais siglas identificam os diferentes antagonistas; os algarismos 1 e 2 que aparecem após a identificação dos tratamentos referem-se ao número de aplicações (uma ou duas) feitas com o antagonista.

refletiu pouco no peso da parte aérea destas parcelas. Também os isolados 3B1 e b4 mostraram aumentos na sobrevivência das plantas superiores a 30 pontos percentuais (37,1 e 33,9, respectivamente).

O efeito do número de aplicações não foi uniforme entre os tratamentos. Para alguns isolados (6A1 e 3B1), a segunda aplicação aumentou a sobrevivência das plantas; para outros (5B3 e b4), diminuiu a sobrevivência, ou seja, provocou mais doença que uma simples aplicação; para outros isolados (b35 e a12), ainda, praticamente não alterou o número de plantas sobreviventes.

Deve-se ressaltar que este experimento foi feito sob as mesmas condições do experimento com fungicidas. Nota-se que o tratamento com o isolado 6A1, duas aplicações, teve uma porcentagem de sobrevivência de plantas semelhante ao do tratamento com vinclozoline, na menor dosagem. Apesar de não se tratar do mesmo experimento, a comparação é importante, pois explicita a possibilidade de controle desta doença através da introdução de um agente microbiano, com eficiência comparável à de um fungicida.

5. DISCUSSÃO

5.1. Experimentos “in vitro”

5.1.1. Testes com fungicidas

Os testes “in vitro” forneceram bons indícios sobre a ação dos produtos “in vivo”. De modo geral, aqueles produtos que conseguiram inibição significativa do crescimento micelial do patógeno em dosagens baixas (menores que 1 ppm) foram capazes de inibir a ocorrência da doença em solo com alta infestação.

Vinclozoline, no primeiro ensaio (Tabela 1), inibiu totalmente o crescimento do patógeno na dosagem de 1 ppm e no segundo ensaio (Tabelas 2 e 3 ; Figura 1) teve este mesmo efeito, para dois dos isolados, na dosagem de 0,5 ppm. SMITH *et al.* (1991) também conseguiram inibição completa de *S. cepivorum* a 1 ppm; já CORBAZ & DORSAZ (1992) relataram que o crescimento do patógeno em BDA foi paralisado com concentrações entre 1 e 10 ppm, do mesmo fungicida.

SMITH *et al.* (1991) comentam que o composto fluazinam foi mais tóxico ao patógeno em baixas concentrações, quando comparado aos produtos do grupo das dicarboximidas, o que está em concordância com os resultados do presente trabalho. No entanto, os mesmos autores relatam que não houve inibição completa do crescimento do fungo, mesmo na concentração de 100 ppm de fluazinam. O isolado de *S. cepivorum* utilizado neste ensaio teve seu crescimento inibido em 91,3% pela dosagem de 0,5 ppm de fluazinam.

5.1.2. Testes com antagonistas

Os isolamentos de agentes microbianos a partir dos escleródios do patógeno e com a utilização de iscas recuperaram um maior número de antagonistas do que a diluição seriada de solo (Tabelas 5 e 6). O isolamento de microrganismos associados a estruturas do patógeno (escleródios e micélio) ofereceu, assim, maiores chances de obter microrganismos antagônicos a *S. cepivorum*. O método de iscas permitiu o isolamento de maior número de fungos do que os outros métodos utilizados. Possivelmente, este método favoreça o isolamento de fungos micoparasitas com crescimento rápido, já que as sementes de trigo ficam apenas 48 horas em contato com o solo. NUNES (1992), comentando o método de iscas, considera que o micélio do patógeno sobre as sementes de trigo parece ser um fator importante no isolamento seletivo de antagonistas. O isolamento a partir dos escleródios foi também bastante seletivo para a obtenção de potenciais antagonistas. Grande parte dos microrganismos associados aos escleródios parece ter algum tipo de relação antagônica com estas estruturas.

Estes métodos, portanto, podem ser incluídos nos processos de obtenção e seleção de microrganismos eficientes para o controle biológico de patógenos do solo (mais especificamente de fungos formadores de escleródios), pois tem o potencial de aumentar a eficiência destas etapas do programa de controle biológico.

Os testes de antagonismo feitos na forma de culturas pareadas quantificaram a atividade dos isolados frente ao patógeno e também forneceram alguma informação sobre os diferentes modos de ação de isolados fúngicos e bacterianos. Assim, as substâncias liberadas pelas colônias de bactérias e difundidas pelo meio paralisavam o crescimento do patógeno, formando um halo bem nítido. Na região da paralisação do crescimento, o micélio de *S. cepivorum* tornava-se escuro e as pontas das hifas, inchadas. No entanto, estas substâncias parecem ter agido apenas inibindo o avanço micelial do fungo, já que nenhum dos isolados selecionados inibiu a formação de escleródios na

colônia do patógeno. Uma contagem do número de escleródios nas culturas pareadas e na testemunha poderia dar indícios sobre um possível efeito destes antibióticos sobre a formação de escleródios de *S. cepivorum*.

Nas culturas pareadas feitas com os isolados fúngicos não foi observada a formação de halo de inibição. Os fungos paravam de crescer no encontro com a colônia do patógeno ou, então, avançavam sobre ela. A inibição da formação de escleródios na colônia de *S. cepivorum* pode ser devido ao avanço muito rápido de alguns isolados sobre a colônia do patógeno, denotando micoparasitismo (JACKSON *et al.* 1991); em alguns casos, porém, pode haver também o envolvimento de substâncias antibióticas, com ação sobre esta fase de formação dos escleródios.

JACKSON *et al.* (1991) observaram diversos efeitos sobre a formação de escleródios deste fungo, em resposta a testes com microrganismos. Alguns isolados preveniram a formação dos escleródios nos estágios iniciais, enquanto outros agiram sobre a maturação destas estruturas, provavelmente bloqueando os passos metabólicos que levam à pigmentação. A disponibilidade de nutrientes pode influenciar a formação e pigmentação dos escleródios; alguns isolados de crescimento muito rápido, como *Trichoderma* spp. podem agir desta maneira. Estes autores comentam, ainda, que alguns fungos não tiveram nenhum efeito sobre a formação e maturação destas estruturas, mas em 40% destes casos, o número de escleródios foi significativamente menor que nas placas controle, indicando uma interação mais sutil.

5.2. Experimentos “in vivo”

5.2.1. Métodos de inoculação

A inoculação com escleródios em solo natural, não autoclavado, pretendeu simular o que ocorre na natureza e foi bem sucedida em causar doença. As interações entre os escleródios do patógeno e a microflora residente do solo e os exsudatos da planta de cebola são complexas e foram respeitadas neste ensaio em condições controladas. A germinação dos escleródios em um ambiente não esterilizado é inibida pela ação da microflora e só vai ocorrer na presença de exsudatos de espécies de *Allium*. Esta germinação é caracterizada pela formação de um tufo de hifas, de onde o micélio se desenvolve. Em condições estéreis, a germinação dos escleródios segue um outro padrão, com a emissão de uma hifa individual, e as respostas do fungo ao estímulo dos exsudatos da raiz também são diferentes (COLEY-SMITH, 1960; CROWE *et al.*, 1980).

O fato de haver ocorrido maior número de mortes em solo natural do que em solo autoclavado (Tabela 9; Figuras 2 e 3), ainda que a diferença não tenha sido significativa, pode ser devido ao maior número, no solo natural, de bactérias que transformam o exsudato de cebola em substância que estimula a germinação do escleródio (KING & COLEY-SMITH, 1969).

O método de inoculação envolvendo escleródios e solução de glicose a 0,5% foi eficiente em causar a doença somente em solo natural, não autoclavado. O resultado esperado, baseado em conclusões de ELNAGHY *et al.* (1971), era que a solução de glicose 0,5% estimulasse mais a germinação de escleródios em solo autoclavado. As conclusões de ELNAGHY *et al.* (1971), entretanto, foram obtidas através de experimento conduzido em solo mantido em condições axênicas, em placas de Petri, o que não aconteceu no presente ensaio. Supõe-se, então, que a glicose tenha estimulado

os microrganismos saprófitas que estavam recontaminando o solo previamente autoclavado, e que essa população de microrganismos tenha aumentado a fungistase do solo, inibindo a germinação dos escleródios.

As inoculações com suspensão de micélio causaram pouca doença, nos dois solos, provavelmente porque o micélio não se desenvolveu nas condições em que o experimento foi realizado. SCOTT (1956) já relatou, há muito tempo, que o micélio de *S. cepivorum* praticamente não tem atividade saprofítica, pois mesmo em solo esterilizado, suplementado com nutrientes, cresce muito devagar.

As diferenças de peso de parte aérea das parcelas entre os solos autoclavado e não autoclavado devem-se, provavelmente, à maior disponibilidade de nutrientes para as plantas no solo autoclavado utilizado, bastante rico em matéria orgânica.

5.2.2 Controle químico

Trabalhos recentes (WALKER *et al.*, 1986; WALKER, 1987; COLEY-SMITH, 1987; STEWART & FULLERTON, 1991; FULLERTON & STEWART, 1991; SLADE *et al.*, 1992) vêm relatando a ineficiência de produtos do grupo químico das dicarboximidas (iprodione e vinclozoline) no controle da podridão branca da cebola, devido ao aumento da degradação microbiana destes produtos em solos nos quais eles são continuamente aplicados. SLADE *et al.* (1992) induziram esta degradação em condições de laboratório e concluíram que procymidone é mais resistente a este fenômeno, e, desse modo, tem maior persistência no solo. Este fato é confirmado no campo, onde procymidone vem oferecendo alto nível de controle quando aplicado nas mesmas condições que iprodione e vinclozoline (tratamento de sementes aliado a quatro pulverizações foliares) (STEWART & FULLERTON, 1991). O procymidone é do mesmo grupo químico do iprodione e do vinclozoline (dicarboximidas), mas não tem registro ou recomendação para o controle da podridão branca de *Allium* spp. no Brasil. A

literatura tem exemplos da maior eficiência de procymidone no controle da doença quando comparado ao iprodione e vinclozoline (PORTER *et al.*, 1991; FULLERTON & STEWART, 1991; STEWART & FULLERTON, 1991).

PORTER *et al.* (1991) e STEWART & FULLERTON (1991) verificaram, ainda, que procymidone formulado em grânulos e aplicado logo após o plantio na dosagem de 2,5 kg i.a./ha foi muito eficiente em reduzir a incidência da podridão branca em áreas produtoras de cebola. PORTER *et al.* (1991) conseguiram, também, redução considerável da doença com imersão das raízes das mudas em suspensão de 5 g de procymidone por litro de calda.

Houve detecção “in vitro” do potencial de *S. cepivorum* em desenvolver resistência a fungicidas do grupo das dicarboximidas. Alguns isolados classificados como resistentes cresceram em meio com mais de 1.000 ppm de iprodione ou vinclozoline. No entanto, a ocorrência de isolados resistentes é muito baixa e variável e só foi detectada em laboratório (LITTLE & RAHE, 1984). CORBAZ & DORSAZ (1992) também comentaram a capacidade de *S. cepivorum* de desenvolver resistência estável “in vitro” a vinclozoline, através de mutação no micélio.

Estas informações relatadas na literatura são importantes para a situação atual das culturas de alho e cebola no Brasil, já que a importância da doença vem crescendo nas regiões produtoras e os únicos produtos registrados para o controle da podridão branca em alho e cebola são iprodione e vinclozoline.

Novos produtos e alternativas para o controle da doença devem ser pesquisados para que este controle não se torne muito caro ou até inviável, levando ao abandono de áreas produtoras.

O procymidone, no presente trabalho, controlou bem a doença em aplicação no solo, o que concorda com os relatos da literatura (PORTER *et al.*, 1991; FULLERTON & STEWART, 1991; STEWART & FULLERTON, 1991), e ainda mostrou efeito tônico nas plantas de cebola. Os outros produtos testados, tebuconazole, fluazinam e

triadimefon foram tão eficientes quanto o procymidone no controle da podridão branca, com a vantagem que as dosagens aplicadas foram muito menores (Tabela 10; Figura 4).

Alguns dos produtos testados já foram relatados na literatura como sendo fitotóxicos para a cebola e outras plantas. Diniconazole mostrou-se bastante fitotóxico às plantas de cebola, nas duas dosagens empregadas no presente trabalho, reduzindo drasticamente o estande e o crescimento das plantas. O diniconazole é um composto do grupo dos triazóis, que inibe a biossíntese do ergosterol em células fúngicas. Além disso, este composto apresenta um atividade reguladora de crescimento em algumas plantas (TAKANO & KATO, 1987), e provavelmente foi esta atividade que foi fitotóxica para a cebola. TOLEDO & ROLIM (1989) também perceberam esta ação do fungicida testando várias dosagens de diniconazole para o controle da ferrugem (*Puccinia hordiana*) do crisântemo. Estes autores relataram que a dose de 40 g i.a./100l de calda reduziu significativamente a altura das plantas.

O triadimefon e o tebuconazole também foram fitotóxicos nas maiores dosagens utilizadas no ensaio. Tebuconazole reduziu o peso das plantas na maior dosagem, mas não afetou a sobrevivência das plantas e controlou a doença. Já triadimefon afetou a sobrevivência e o peso das plantas na dosagem de 0,023%. CORBAZ & DORSAZ (1992) aplicaram este produto em canteiro, na dosagem de 0,05% e obtiveram bom controle da podridão branca da cebola, não relatando sintomas de fitotoxidez.

As formas de aplicação, efeito residual e custo destes novos produtos devem ser estudados para tornar possível sua utilização em áreas infestadas com *Sclerotium cepivorum*. A avaliação do efeito de produtos fungicidas na população do fungo no solo é de extrema importância. Em áreas onde não se realiza o controle efetivo da podridão branca, o plantio de alho ou cebola pode tornar-se inviável de uma estação de cultivo para outra. Dessa maneira, um produto que conseguisse reduzir o número de escleródios viáveis em uma área seria muito valioso para campos muito infestados. RESENDE &

ZAMBOLIM (1987), preocupados com esta questão, avaliaram o efeito de iprodione, formaldeído e PCNB, aplicados em várias dosagens, sobre a população do fungo no solo e concluíram que nenhum dos produtos reduziu o número de escleródios na área, mesmo quando houve controle eficiente da doença.

5.2.3. Controle Biológico

Publicações recentes sobre controle biológico (DEACON & BERRY, 1993; COOK, 1993) reproduzem uma frase de Garrett¹, com a qual, dizem os autores, é fácil de concordar: *"There are no shortcuts to biological control"*. Ou seja, o caminho para se chegar ao controle biológico eficaz é longo e tortuoso, e todos os passos dados neste caminho são necessários e indispensáveis. Em termos de controle biológico com a introdução de microrganismos, que é a linha na qual o presente trabalho se insere, COOK (1993) enumera como críticas as seguintes etapas deste caminho: (a) **descoberta de potenciais antagonistas**, que inclui o isolamento de microrganismos de ocorrência natural e teste preliminar para verificar o potencial para controle biológico; desenvolvimento dos microrganismos através de manipulação genética; desenvolvimento preliminar de sistemas de produção massal dos isolados; (b) **testes de performance** dos isolados mais promissores em condições naturais; (c) **produção massal** do(s) isolado(s) selecionado(s) para utilização em campos, pomares ou casa-de-vegetação.

O presente trabalho, dessa maneira, encaixa-se no início da fase de descoberta de potenciais antagonistas a *S. cepivorum*, assim como a maioria dos trabalhos de controle biológico para este patossistema (GHAFFAR, 1969a; OLIVEIRA *et al.*, 1984;

¹ "Não há atalhos para o controle biológico". Garrett, S.D. Toward biological control of soilborne plant pathogens. In: BAKER W.F. & SNYDER, W.C. (ed.) *Ecology of Soil-borne Plant Pathogens*. p 4-17, Berkeley, University of California Press, 1965, 571p.

MOUBASHER *et al.*, 1970; UTKHEDE & RAHE, 1980; WONG & HUGHES, 1986; HARRISON & STEWART, 1988; JACKSON *et al.*, 1991).

A sequência lógica com relação à seleção de microrganismos biocontroladores começa, segundo ANDREWS (1985), pelo estágio de testes “in vitro”, passa para testes “in vivo” em condições controladas e segue, posteriormente, para os testes definitivos, que são os ensaios em campo. WELLER (1988) é de opinião que a seleção preliminar de isolados em meio agarizado pode não ter utilidade, já que não há uma relação generalizada entre a habilidade de um isolado bacteriano em inibir um patógeno “in vitro” e suprimir a doença “in vivo”. No entanto, as eventuais disparidades de comportamento “in vitro” e “in vivo” podem apenas representar diferenças na adaptação ou sobrevivência do microrganismo no meio em que ele foi introduzido (ANDREWS, 1985), e não devem levar ao descarte sumário do isolados. Assim, há necessidade que os ensaios “in vivo” em condições controladas simulem o quanto possível as condições em que os antagonistas serão utilizados, procurando favorecer a sua sobrevivência.

No caso do patossistema estudado no presente trabalho, UTKHEDE & RAHE (1980; 1983a) encontraram boa relação entre a atividade dos isolados contra o patógeno “in vitro” e “in vivo”. Os autores citados testaram, em campo, seis isolados de *Bacillus subtilis* obtidos dos escleródios de *S. cepivorum*, que mostraram antagonismo ao patógeno em meio agarizado (BDA), e quatro deles foram eficientes em controlar a doença quando aplicados em tratamento de sementes.

No presente trabalho de pesquisa procurou-se seguir a sequência lógica referida por ANDREWS (1985), até a fase do ensaio “in vivo” em condições controladas. O isolamento de microrganismos foi feito a partir de amostras de solo contaminado com o patógeno e a partir de estruturas do próprio patógeno, o que, segundo WELLER (1988), aumenta as chances de selecionar isolados eficientes.

Os ensaios com microrganismos “in vitro” reduziram o número de isolados a serem testados “in vivo” e foram úteis para a melhor compreensão da interação entre

patógeno e antagonista. No caso dos testes com isolados fúngicos, onde houve inibição do crescimento micelial e da formação de escleródios, os mecanismos envolvidos podem ser parasitismo, antibiose e competição por nutrientes. Outros ensaios precisariam ser realizados para esclarecer a participação destes mecanismos na inibição observada. A verificação da produção de substâncias antibióticas voláteis e não-voláteis pelos isolados fúngicos (JACKSON *et al.*, 1991) e da interação microscópica entre as estruturas de *S. cepivorum* e dos antagonistas (OLIVEIRA *et al.*, 1984) podem esclarecer as interações entre o patógeno e os fungos antagonísticos.

Os halos de inibição presentes nos testes de antagonismo realizados com isolados bacterianos sugerem que a antibiose seja o principal mecanismo de antagonismo envolvido (ANDREWS, 1985). Informações sobre a natureza e a quantidade de substância antibiótica produzida pelos isolados bacterianos em meio líquido são dados importantes para a seleção destes microrganismos para o controle biológico do patógeno em questão. A termoestabilidade dos metabólitos produzidos é uma característica desejável para a sua posterior industrialização (BETTIOL, 1991). Variações na composição do meio líquido utilizado para o cultivo das bactérias poderiam ser estudadas, visando a maximização da produção de antibióticos. A elaboração de curvas de produção de antibióticos no tempo permitiria comparações entre isolados bacterianos.

Outras informações importantes para a seleção de antagonistas a *S. cepivorum* devem ser obtidas, como, por exemplo, a resistência aos fungicidas utilizados nas culturas de alho e cebola e a estabilidade das substâncias antagonísticas nos processos de formulação dos agentes microbianos.

O ensaio de controle biológico “in vivo” (Tabela 11; Figura 5), realizado em condições controladas, não teve o objetivo de eleger um dos isolados selecionados na fase “in vitro”, mas sim atuar como um teste complementar à fase anterior e permitir a observação do comportamento dos microrganismos na planta e no solo. Todos os tratamentos do ensaio de controle biológico aumentaram, em graus variados, a

sobrevivência das plantas com relação à testemunha inoculada (aumentos de 9,7 a 38,8 pontos percentuais). No entanto, houve grande variação entre as parcelas, o que não permitiu que a análise estatística acusasse diferenças significativas em relação à testemunha inoculada, na maioria dos tratamentos. Um maior número de repetições poderia definir melhor estas diferenças.

O efeito dos tratamentos na redução da ocorrência da doença pode ser devido à presença de substâncias antibióticas nos caldos aplicados, à competição por nutrientes exercida pelos microrganismos introduzidos ou ao parasitismo de estruturas do patógeno. As duas últimas explicações exigiriam que os microrganismos introduzidos sobrevivessem no solo por algum tempo. UTKHEDE & RAHE (1980), investigando o efeito de *B. subtilis* na redução da incidência de podridão branca em cebola, em ensaios de campo, sugerem que a produção de antibióticos esteja envolvida na proteção contra a doença oferecida por estas bactérias, aplicadas em tratamento de sementes. Os autores acreditam que seja igualmente possível, e não excludente, a hipótese que estas bactérias atuem no solo como colonizadoras da rizosfera da planta e metabolizem as substâncias que estimulam o patógeno, exsudadas pelas raízes da cebola. Dessa maneira, sugerem os autores, a germinação dos escleródios seria reduzida passivamente, o que resultaria em menor incidência da doença.

Os ensaios com microrganismos “in vivo”, em condições controladas, não devem ser considerados definitivos, mas segundo ANDREWS (1985), têm a flexibilidade como a principal vantagem, possibilitando o teste de inúmeras variáveis em tempo e espaço reduzidos. Em câmara de crescimento, onde as condições ambientais são bem controladas, ensaios realizados em épocas diferentes podem ser comparados, mantidas as mesmas condições. Na pesquisa em questão, vários testes complementares poderiam ser realizados: (a) comparar o desempenho de maior número de isolados; (b) testar diversas formulações (polvilhamento, pellet, caldo fermentado) em diferentes concentrações; (c) testar misturas de isolados de antagonistas; (d) variar a época e número de aplicações; (e) verificar o comportamento dos microrganismos introduzidos

em diferentes tipos de solo, temperaturas, teores de umidade do solo e concentrações de inóculo do patógeno.

Um outro ponto muito importante a ser verificado, “in vitro” e “in vivo”, é a ação dos microrganismos e seus metabólitos sobre as estruturas do patógeno. A constatação de que determinado microrganismo esteja agindo como fungicida, ou seja, causando a morte de escleródios e micélio de *S. cepivorum*, é de muito valor para o manejo de áreas altamente infestadas.

O passo seguinte na seleção de antagonistas seria a realização de testes definitivos em áreas naturalmente infestadas, onde seria verificado o sucesso do microrganismo selecionado em condições naturais. Os ensaios em campo devem ser repetidos em vários locais e por vários anos, antes de decidir pela eficiência do agente de biocontrole (ANDREWS, 1985).

VALDEBENITO-SANHUEZA (1991) chama a atenção para as conseqüências de práticas culturais, tais como manejo dos restos de cultura, preparo do solo, tratamentos químicos (pesticidas e fertilizantes químicos) e controle de umidade do solo, no desempenho de antagonistas residentes ou introduzidos. Os ensaios de campo com o agente microbiano selecionado devem levar em conta estas práticas, em diferentes situações.

ADAMS (1990), ainda nesta linha, adverte que, para se alcançar um controle economicamente viável com a introdução de antagonistas, é preciso adequar as práticas de cultivo aos requerimentos do microrganismo benéfico. BECKER & SCHWINN (1993) concordam com esta visão, lembrando que o solo é um ambiente menos sujeito a variações extremas de temperatura, umidade ou radiação, mas a diversidade biótica que o solo contém requer que um microrganismo introduzido adapte-se ao ambiente tão bem como a microflora residente, para que seja bem sucedido em controlar um patógeno.

A introdução massal e regular de um agente de biocontrole no solo pode, em determinada situação, reduzir a incidência de uma doença. No entanto, se esta medida

não for acompanhada de providências que assegurem a adaptação do microrganismo benéfico naquele ambiente, estará apenas reproduzindo a mentalidade do controle químico, e, provavelmente, fracassará em oferecer um controle econômico. COOK (1993) defende que microrganismos introduzidos como agentes de controle biológico não sejam vistos sob o mesmo enfoque do paradigma corrente do controle químico, ou seja, caso um determinado isolado mostre-se eficiente, é logo chamado de “biopesticida” e espera-se que funcione da mesma maneira onde quer que a cultura em que é utilizado seja cultivada.

O controle químico de fitopatógenos é muito mais fácil, segundo MENDGEM *et al.* (1992), pois as substâncias ativas podem ser usadas contra vários fungos, em diferentes partes da planta. Os sistemas biológicos, ao contrário, são bem especializados. Fungos que parasitam uma região determinada da raiz ocupam um nicho e, para controlar tais patógenos, um microrganismo benéfico deve ser capaz de competir por este nicho. Os sistemas de controle biológico necessitam, assim, de uma lógica diferente daquela do controle químico, de mentalidade e metodologias próprias, que se difundam entre pesquisadores e usuários destes sistemas.

Por fim, o controle biológico, pelo menos no atual estágio de desenvolvimento, deve ser encarado não como uma solução por si só, e, sim, como uma medida de controle adicional, a ser empregado no contexto mais amplo do manejo integrado de doenças.

6. CONCLUSÕES

- O método de iscas e o isolamento a partir de escleródios são bastante eficientes no isolamento seletivo de microrganismos com potencial antagônico a *Sclerotium cepivorum*.
- Com base nos valores de ED50 e MIC obtidos nos testes realizados “in vitro” conclui-se que os produtos procymidone, fluazinam, vinclozoline, tebuconazole e diniconazole são altamente fungitóxicos para *Sclerotium cepivorum*; os primeiros quatro produtos citados também são eficientes em controlar a doença em cebola em condições de câmara de crescimento.
- A inoculação de *Sclerotium cepivorum* pela infestação do solo com escleródios produzidos em laboratório foi eficiente em provocar a doença em mudas de cebola, em condições controladas; já a inoculação com suspensão de micélio não foi eficiente em causar a doença nestas condições.
- Os fungicidas tebuconazole, triadimefon e diniconazole são fitotóxicos para a cebola, em determinadas dosagens.
- Os tratamentos com antagonistas “in vivo”, em condições de câmara de crescimento, tendem a aumentar a sobrevivência das plantas, em parcelas infestadas com *Sclerotium cepivorum*.

- Os novos fungicidas e os antagonistas testados em condições controladas mostraram bom potencial no controle da podridão branca da cebola, mas estudos complementares são necessários para viabilizar a aplicação destes produtos.

7. LITERATURA CITADA

- ABD-EL-MOITY, T.H. & SHATLA, M.N. Biological control of white rot disease of onion (*Sclerotium cepivorum*) by *Trichoderma harzianum*. **Phytopath. Z.**, **100**: 29-35, 1981
- ABD-EL-MOITY, T.H.; PAPAIVIZAS, G.C.; SHATLA, M.N. Induction of new isolates of *Trichoderma harzianum* tolerant to fungicides and their experimental use for control of white rot of onion. **Phytopathology**, **72**(4): 396-400, 1982.
- ADAMS, P. The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, **28**: 59-72, 1990.
- ADAMS, P.B & PAPAIVIZAS, G.C. Effects of inoculum density of *Sclerotium cepivorum* and some soil environmental factors on disease severity. **Phytopathology**, **61**: 1253-1256, 1971.
- AHMED, A.H.M. & TRIBE, H.T. Biological control of white rot of onion (*Sclerotium cepivorum*) by *Coniothyrium minitans*. **Plant Pathology**, **26**: 75-78, 1977.
- ANDREWS, J.H. Strategies for selecting antagonistic microorganisms from the phylloplane. In: WINDELS, C.E. & LINDOW, S.E. (eds.) **Biological control in the phylloplane**. St. Paul, The American Phytopathological Society, 1985, p. 31-44.
- BECKER, O.J. & SCHWINN, F.J. Control of soil-borne pathogens with living bacteria and fungi: status and outlook. **Pesticide Science**, **37**: 355-363, 1993.
- BETTIOL, W. Seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos. In: BETTIOL, W. (org.). **Controle biológico de doenças de plantas**, Brasília, EMBRAPA/CNPDA, 1991, 388p., p. 223-236.
- BRENNEMAN, T.B.; MURPHY, A.P.; CSINOS, A.S. Activity of tebuconazole on *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*, two soil-borne pathogens of peanut. **Plant Disease**, **75**(7): 744-747, 1991.
- COLEY-SMITH, J.R. Studies of the biology of *Sclerotium cepivorum* Berk. IV. Germination of sclerotia. **Annals of Applied Biology**, **48**(1): 8-18, 1960.
- COLEY-SMITH, J.R. Methods for the production and use of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* in field germination studies. **Plant Pathology**, **34**: 381-384, 1985.
- COLEY-SMITH, J.R. Alternative methods of controlling white rot disease of Allium. In: CHET, I. (ed.) **Innovative approaches to plant disease control**. New York; Wiley Interscience, 1987. 372 p., p.161-178.
- COLEY-SMITH, J.R. White rot disease of *Allium*: problems of soil-borne diseases in microcosm. **Plant Pathology**, **39**: 214-222, 1990.

- COLEY-SMITH, J.R.; KING, J.E.; DICKINSON, D.J.; HOLT, R.W. Germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* Berk. under aseptic conditions. **Annals of Applied Biology**, **60**: 109-115, 1967.
- COLEY-SMITH, J.R. & KING, J.E. The production by species of *Allium* of alkyl sulphides and their effect on germination of *Sclerotium cepivorum* Berk. **Annals of Applied Biology**, **64**: 289-301, 1969.
- COLEY-SMITH, J.R.; MITCHELL, C.M.; SANSFORD, C.E. Long-term survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and *Stromatinia gladioli*. **Plant Pathology**, **39**(1): 58-69, 1990.
- COOK, R.J. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, **31**: 53-80, 1993.
- COOK, R.J. & BAKER, K.F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. Saint Paul, The American Phytopathological Society, 1983, 539 p.
- CORBAZ, R. & DORSAZ, L. Lutte chimique contre la pourriture blanche de l'oignon (*Sclerotium cepivorum*). **Revue suisse de viticulture arboriculture horticulture**, **24**(3): 147-149, 1992.
- 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**, **70**(1): 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**, **70**(1): 74-78, 1980.
- CRUZ FILHO, J.; OLIVEIRA, A.C.; GOMIDE, J.S.; PÁDUA, J.G.; PENA, C.A.F.; JACCOUD FILHO, D.S.; PENA, R.M. Controle químico da podridão branca do alho. Viçosa, UFV, Imprensa Universitária, 1982, 8 p. (Informe Técnico, 29).
- CSINOS, A.S. Targeting fungicides for control of southern stem rot on peanut. **Plant Disease**, **73**(9): 723-726, 1989.
- DEACON, W.D. & BERRY, L.A. Biocontrol of soil-borne plant pathogens: concepts and their applications. **Pesticide Science**, **37**: 417-426, 1993.
- EL-RAZIK, A.A.A.; EL-SHABRAWY, A.M.; SELLAM, M.A.; EL-RAHIM, M.H.A. Effectiveness of certain fungi and bacteria associated with sclerotia of *Sclerotium cepivorum* in upper Egypt soil on controlling white rot of onion. **Egyptian Journal of Phytopathology**, **17**(2): 107-114, 1986. Apud **Review of Plant Pathology**, **67**(2): 112, 1988.(Resumo)
- ELNAGHY, M.A.; MOUBASHEN, A.H.; MEGALA, S.E. Stimulation of sclerotial germination of *Sclerotium cepivorum* by host-plant extract. **Plant and Soil**, **34**: 109-119, 1971.

- ENTWISTLE, A.R. & MUNASINGHE, H.L. The effect of iprodione in granule or combined granule and stem-base applications on white rot disease (*Sclerotium cepivorum*) of spring-sown salad onions. **Plant Pathology**, **29**: 149-152, 1980a.
- ENTWISTLE, A.R. & MUNASINGHE, H.L. The effect of seed and stem-base treatments with thiophanate-methyl on the control of white rot disease (*Sclerotium cepivorum*) of autumn-sown salad onions. **Plant Pathology**, **29**: 153-158, 1980b.
- ENTWISTLE, A.R. & MARIAN, S.E. Evaluation of carboxin, oxycarboxin, triadimefon and tolclofos-methyl for the control of white rot in spring-sown salad onions. **Annals of Applied Biology**, **102**: 64-64, 1983.
- FANCELLI, M.I. Ocorrência e adaptabilidade de linhagens de *Alternaria dauci* (Kühn) Groves & Skolko resistentes ao fungicida iprodione. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP 1987. 184p. (Dissertação de Mestrado).
- FULLERTON, R.A. & STEWART, A. Chemical control of onion white rot (*Sclerotium cepivorum* Berk.) in the Pukekohe district of New Zealand. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, **19**: 121-127, 1991.
- GHAFFAR, A. Biological control of white rot of onion I. Interactions of soil micro-organisms with *Sclerotium cepivorum* Berk. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, **38**: 101-111, 1969a.
- GHAFFAR, A. Biological control of white rot of onion II. Effectiveness of *Penicillium nigricans* (Bain.) Thom. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, **38**: 113-127, 1969b.
- GHINI, R. & KIMATI, H. **Método de iscas para obtenção de isolados de *Trichoderma* antagônicos a *Botrytis cinerea***. Jaguariúna, EMBRAPA-CNPDA, 1989, 13p. (EMBRAPA-CNPDA. Boletim de Pesquisa, 3).
- GLADDERS, P.; WAFFORD, J.D.; DAVIES, J.M.L. Control of *Allium* white rot in module-raised bulb onions. Monograph - British Crop Protection Council, n^o. 39, p. 371-378, 1988. Apud **Review of Plant Pathology**, **69**(2): 94, 1990. (Resumo)
- HARRISON, Y.A. & STEWART, A. Selection of fungal antagonists for biological control of onion white rot in New Zealand. **New Zealand Journal of Experimental Agriculture**, **16**: 249-256, 1988.
- HOMECHIN, M. Controle biológico de patógenos do solo In: BETTIOL, W. (org.). **Controle biológico de doenças de plantas**, Brasília, EMBRAPA/CNPDA, 1991, 388 p., p. 7-24.
- JACKSON, A.M.; WHIPPS, J.M.; LYNCH, J.M. In vitro screening for the identification of potential biocontrol agents of *Allium* white rot. **Mycol. Research**, **95** (4): 430-434, 1991.

- KATAN, J.; GREENBERGER, A.; ALON, H.; GRINSTEIN, A. Solar heating by polyethylene mulching for the control of disease caused by soil-borne pathogens. **Phytopathology**, **66**: 683-688, 1976.
- KIMATI, H. Doenças do alho e da cebola. In: GALLI, F. (org.) **Manual de Fitopatologia**. Doenças das Plantas Cultivadas, vol 2., 1980, p.49-64.
- KING, J.E. & COLEY-SMITH, J.R. Production of volatile alkyl sulphide by microbial degradation of synthetic alliin and alliin-like compounds, in relation to germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* Berk. **Annals of Applied Biology**, **64**: 303-314, 1969.
- LITTLE, E.R. & RAHE, J.E. Specific tolerance of *Sclerotium cepivorum* to dicarboximide fungicides. **Plant Disease**, **68**(5): 371-374, May 1984.
- LOCKE, S.B. Botran tolerance of *Sclerotium cepivorum* isolates from fields with different botran treatment histories. **Phytopathology**, **59**: 13, 1969. (Resumo)
- MENDGEN, K.; SCHIEWE, A.; FALCONI, C. Biological control of plant diseases. **Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer**, **45**: 5-20, 1992.
- MERRIMAN, P.R.; ISAACS, S.; MACGREGOR, R.R.; TOWERS, G.B. Control of white rot on dry bulb onions with artificial onion oil. **Annals of Applied Biology**, **96**: 163-168, 1980.
- MERRIMAN, P.R.; SAMSON, I.M.; SCHIPPERS, B. Stimulation of germination of sclerotia at different depths in soil by artificial onion oil. **Neth. J. Pl. Path.**, **87**: 45-43, 1981.
- MOUBASHER, A.H.; ELNAGHY, M.A.; MEGALA, S.E. Fungi isolated from sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and from soil and their effects upon the pathogen. **Plant and Soil**, **33**: 305-312, 1970.
- MOUSA, O.M.; KHALIL, F.A.; RAGAB, M.M. Variability of *Sclerotium cepivorum* Berk., microflora of unviable sclerotia and their antagonistic effect to this pathogen. **Egyptian Journal of Phytopathology**, **19**(1-2): 1-14, 1987. Apud **Review of Plant Pathology**, **68**(10): 544, 1989. (Resumo)
- NUNES, M.E.T. Efeito da solarização do solo no controle de *Sclerotium cepivorum* Berk., agente causal da podridão branca da cebola (*Allium cepa*) e seleção de microrganismos antagonísticos ao patógeno *in vitro*. Piracicaba, ESALQ/USP., 1992. 81 p. (Dissertação de mestrado).
- NUNES, M.E.T. & FERREIRA, M.D. Podridão branca: um problema que se alastra. **Folha Rural**, Cooxupé, São José do Rio Pardo, n.º 131, p.2, 1989.
- OLIVEIRA, V.L.; BELLEI, M.M.; BORGES, A.C. Control of white rot of garlic by antagonist fungi under controlled environmental conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, **30**: 884-889, 1984.

- PORTER, I.J; MAUGHAN, J.P.; TOWERS, G.B. Evaluation of seed, stem and soil applications of procymidone to control white rot (*Sclerotium cepivorum* Berk.) of onions. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, 31: 401-406, 1991.
- RESENDE, M.L.V. Modelo de previsão e controle de podridão branca do alho (*A. sativum* L.) baseado no número de escleródios de *Sclerotium cepivorum* Berk. no solo. Viçosa, UFV, 1985, 77 p. (Dissertação de mestrado).
- RESENDE, M.L.V. & ZAMBOLIM, L. Flutuação populacional de escleródios de *Sclerotium cepivorum* no solo, em função do tratamento com diferentes fungicidas no plantio do alho. **Fitopatologia brasileira**, 12(1): 65-70, abril/1987.
- RESENDE, M.L.V.; ZAMBOLIM, L.; CRUZ F^o, J. Eficiência de fungicidas no controle da podridão branca do alho (*Allium sativum*), de acordo com o nível de escleródios de *Sclerotium cepivorum* no solo. **Fitopatologia brasileira**, 12(1): 71-78, abril/1987.
- RYAN, E.W & KAVANAGH, T. White rot of onion (*Sclerotium cepivorum*) 1. Control by pelleting of onion seed. **Irish Journal of Agricultural Research**, 15(3): 317-323, 1976a.
- RYAN, E.W & KAVANAGH, T. White rot of onion (*Sclerotium cepivorum*) 2. Control by fungicidal dusting of onion sets. **Irish Journal of Agricultural Research**, 15(3): 325-329, 1976b.
- SCOTT, M.R. Studies of the biology of *Sclerotium cepivorum* Berk. I. Growth of the mycelium in soil. **Annals of Applied Biology**, 44 (4): 576-583, 1956.
- SLADE, E.A.; FULLERTON, R.A.; STEWART, A.; YOUNG, H. Degradation of the dicarboximide fungicides iprodione, vinclozin and procymidone in Patumahoe clay loam soil, New Zealand. **Pesticide Science**, 35: 95-100, 1992.
- SMITH, F.D; PHIPPS, P.M.; STIPES, R.J. Agar plate, soil plate and field evaluation of fluzinam and other fungicides for control of *Sclerotinia minor* on peanut. **Plant Disease**, 75(11): 1138-1143, 1991.
- STEWART, A. & HARRISON, Y.A. Mycoparasitism of sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. **Australasian Plant Pathology**, 18(1): 10-14, 1988.
- STEWART, A. & FULLERTON, R.A. Additional studies on the chemical control of onion white rot (*Sclerotium cepivorum* Berk.) in New Zealand. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, 19: 129-134, 1991.
- TAKANO, H. & KATO, T. Biological activity and mode of action of diniconazole. Pesticide Science and Biotechnology. **Proceedings** of the Sixth International Congress of Pesticide Chemistry, Canada, 1987, p. 197-200. (Resumo)
- TOLEDO, A.C. & ROLIM, P.R.R. Seleção de fungicidas para o controle da ferrugem branca (*Puccinia horiana*) do crisântemo. **Summa Phytopathologica**, 15: 238-245, jul/dez, 1989.

- UTKHEDE, R.S. & RAHE, J.E. Screening commercial onion cultivars for resistance to white rot. **Phytopathology**, **68**: 1080-1083, 1978.
- UTKHEDE, R.S. & RAHE, J.E. Wet-sieving floatation technique for isolation of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* from muck soil. **Phytopathology**, **69**(3): 295-297, 1979.
- UTKHEDE, R.S. & RAHE, J.E. Biological control of onion white rot. **Soil Biol. Biochem.**, **12**: 101-104, 1980.
- UTKHEDE, R.S. & RAHE, J.E. Chemical and biological control of onion white rot in muck and mineral soils. **Plant Disease**, **67**: 153-155, 1983a.
- UTKHEDE, R.S. & RAHE, J.E. Effect of *Bacillus subtilis* on growth and protection of onion against white rot. **Phytopath. Z.**, **106**: 199-203, 1983b.
- VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. Práticas agrícolas e sua influência no controle biológico de doenças. In: BETTIOL, W. (org.). **Controle biológico de doenças de plantas**, Brasília, EMBRAPA/CNPDA, 1991, 388 p., p.195-200.
- WALKER, A. Further observations on the enhanced degradation of iprodione and vinclozolin in soil. **Pesticide Science**, **21**: 219-231, 1987.
- WALKER, A.; BROWN, P.A.; ENTWISTLE, A.R. Enhanced degradation of iprodione and vinclozolin in soil. **Pesticide Science**, **17**: 183-193, 1986.
- WALKER, J.C. The influence of soil temperature and soil moisture upon white rot of *Allium*. **Phytopathology**, **16**: 696-710, 1926.
- WELLER, D.M. Biological control of soil-borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, **26**: 379-407, 1988.
- WICKS, T. & PHILP, B. Effects of iprodione and vinclozolin seed treatments on germination, emergence and plant growth in onion. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, **25**: 465-469, 1985.
- WONG, C.W. & HUGHES, I.K. *Sclerotium cepivorum* Berk. in onion (*Allium cepa*) crops: isolation and characterization of bacteria antagonistic to the fungus in Queensland. **Journal of Applied Bacteriology**, **60**: 57-60, 1986.