SOLARIZAÇÃO DO SOLO E SELEÇÃO DE
MICRORGANISMOS ANTAGÔNICOS PARA O
CONTROLE DE *Sclerotium cepivorum*
Berk., AGENTE CAUSAL DA PODRIDÃO
BRANCA DA CEBOLA (*Allium cepa* L.)

MARIA EDNA TENÓRIO NUNES

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. 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.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo, Brasil
1992

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

Nunes, Maria Edna Tenório

N972s Solarização do solo e seleção de microrganismos
 antagônicos para o controle de *Sclerotium cepivorum*
 Berk., agente causal da podridão branca da cebola
 (*Allium cepa* L.). Piracicaba, 1992.
 75p.

Diss. (Mestre) - ESALQ

Bibliografia.

1. Cebola - Doença 2. Podridão branca da cebola -
Controle biológico 3. Solo - Patógeno - Controle
por solarização 4. Solo - Solarização - Efeito I.
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Pi-
racicaba

CDD 632.44
635.25

SOLARIZAÇÃO DO SOLO E SELEÇÃO DE
MICRORGANISMOS ANTAGÔNICOS PARA O
CONTROLE DE *Sclerotium cepivorum*
Berk., AGENTE CAUSAL DA PODRIDÃO
BRANCA DA CEBOLA (*Allium cepa* L.)

Aprovado em 27.02.1992

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Hiroshi Kimati

ESALQ/USP

Prof. Dr^a Lilian Amorim

ESALQ/USP

Dr^a Raquel Ghini

CNPDA/EMBRAPA

Prof. Dr. Hiroshi Kimati

Orientador

AGRADECIMENTOS

A todos que colaboraram neste trabalho e em especial:

- Ao Prof. Dr. Hiroshi Kimati, pela orientação, estímulo, amizade e apoio,

- Aos professores do Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP, pelos ensinamentos,

- À Cooperativa Regional dos Cafeicultores em Guaxupé, Núcleo de São José do Rio Pardo, na pessoa do Engº Agrº Marcos David Ferreira, que tornou possível a execução dos ensaios de campo,

- Aos colegas e funcionários do Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP,

- Ao Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, da FEIS/UNESP, pela concessão de afastamentos que permitiram a conclusão do trabalho, após meu ingresso nesta instituição,

- A Engº Agrº Marilene Tenguan Iamauti, pelo constante estímulo, apoio e amizade,

- A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
Resumo.....	viii
Summary.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Aspectos gerais sobre a doença.....	3
2.1.1. Histórico.....	3
2.1.2. Etiologia e Sintomatologia.....	4
2.1.3. Controle.....	7
2.2. Solarização no controle de doenças de plantas.....	10
2.3. Obtenção de microrganismos antagônicos para o controle de patógenos do solo.....	17
2.3.1. Isolamento de antagonistas potenciais.....	17
2.3.2. Seleção dos antagonistas através de testes <i>in vitro</i>	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1. Determinação do número de escleródios no solo.....	23
3.2. Efeito da solarização do solo na incidência da podridão branca em condições de campo.....	24
3.3. Obtenção de isolados.....	26
3.3.1. Isolados de <i>Sclerotium cepivorum</i>	26
3.3.2. Isolados de microrganismos antagônicos.....	27
3.4. Testes de antagonismo.....	30

3.5. Classificação das bactérias antagônicas de acordo com sua capacidade em inibir o crescimento micelial de <i>S. cepivorum</i> "in vitro".....	31
3.6. Avaliação da sensibilidade dos fungos antagônicos a fungicidas.....	32
4. RESULTADOS.....	34
4.1. Determinação do número de escleródios no solo.....	34
4.2. Efeito da solarização do solo sobre a incidência da podridão branca em condições de campo.....	35
4.3. Eficiência do método de iscas no isolamento de microrganismos antagônicos a <i>S. cepivorum</i>	38
4.4. Classificação das bactérias antagônicas de acordo com sua capacidade em inibir o crescimento micelial de <i>Sclerotium cepivorum</i> "in vitro".....	43
4.5. Avaliação da sensibilidade dos fungos antagônicos a fungicidas.....	45
5. DISCUSSÃO.....	47
5.1. Determinação do número de escleródios no solo.....	47
5.2. Efeito da solarização do solo sobre a incidência da podridão branca em condições de campo.....	49
5.3. Eficiência do método de iscas no isolamento de microrganismos antagônicos a <i>Sclerotium cepivorum</i>	52
5.4. Classificação de bactérias antagônicas de acordo com sua capacidade em inibir o crescimento micelial de <i>Sclerotium cepivorum</i> in vitro.....	54

5.5.Avaliação da sensibilidade dos fungos antagônicos a fungicidas.....	57
6.CONCLUSÕES.....	60
7.LITERATURA CITADA.....	61

LISTA DE FIGURAS

FIGURA Nº		PÁGINA
1	Evolução da ocorrência da podridão branca em plantio de cebola em solo naturalmente infestado e submetido a diferentes tratamentos de solarização, em São José do Rio Pardo, São Paulo, 1989.....	39
2	Curvas obtidas a partir da regressão linear dos dados de porcentagem de morte de plantas em diferentes tratamentos de solarização.....	40

LISTA DE TABELAS

TABELA Nº	PÁGINA
1	Tratamentos utilizados no controle da podridão branca da cebola através da solarização, Sítio Taquara Branca, São José do Rio Pardo, São Paulo.....25
2	Número de escleródios de <i>Sclerotium cepivorum</i> /g de solo, detectado em área do sítio Taquara Branca, São José do Rio Pardo, São Paulo, 1989.....35
3	Efeito da solarização aos 60, 90, 120 e 150 dias após o plantio, sobre a incidência da podridão branca em cebola, em solo naturalmente infestado com <i>Sclerotium cepivorum</i> em São José do Rio Pardo, São Paulo, 1989.....37
4	Efeito de isolados de bactérias (AS) e fungos antagônicos (AST) sobre o crescimento micelial de <i>Sclerotium cepivorum</i> em meio de cultura BDA.....41
5	Porcentagem de inibição do crescimento micelial de <i>Sclerotium cepivorum</i> frente a diferentes isolados de bactérias antagônicas.....44

6	Crescimento micelial de isolados de <i>Trichoderma</i> sp (T1 e T2) em meio de cultura B.D.A. contendo diferentes dosagens dos fungicidas Vinclozolin e Iprodione.....	46
---	---	----

SOLARIZAÇÃO DO SOLO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS ANTAGÔNICOS PARA O CONTROLE DE *Sclerotium cepivorum* Berk., AGENTE CAUSAL DA PODRIDÃO BRANCA DA CEBOLA (*Allium cepa* L.)

Autor: Maria Edna Tenório Nunes

Orientador: Prof. Dr. Hiroshi Kimati

RESUMO

A podridão branca é uma importante doença para plantas do gênero *Allium*, causando muitas vezes perdas consideráveis na produção de culturas de cebola em diferentes áreas de produção comercial do mundo.

A capacidade do agente causal em permanecer no solo por muitos anos, mesmo na ausência de plantas hospedeiras, favorecida pela produção de estruturas de resistência, os escleródios, é uma das principais causas que levam à dificuldade de se alcançar níveis de controle da doença altamente satisfatórios.

Visando obter dados sobre novas alternativas de controle da podridão branca, o presente trabalho envolve o estudo da solarização do solo e a seleção de microorganismos antagônicos ao patógeno *in vitro*.

A obtenção dos possíveis antagônicos foi

realizada através da técnica de iscas, que demonstrou-se bastante eficiente no isolamento seletivo destes microrganismos a partir de solo cultivado com cebola.

A solarização do solo envolveu o teste de dois tipos de filmes plásticos para cobertura do solo: transparente e preto, com 50 um e 30 um de espessura, respectivamente. Verificou-se um efeito positivo da solarização no controle da doença em solo naturalmente infestado com o patógeno, demonstrada principalmente pelo atraso no início do desenvolvimento de sintomas nas plantas.

A cobertura do solo com lona plástica transparente resultou em maior diminuição na porcentagem de plantas mortas ou afetadas pela podridão branca.

SOIL SOLARIZATION AND SELECTION OF MICROORGANISMS ANTAGONICS TO THE CONTROL OF *Sclerotium cepivorum* Berk., CAUSAL AGENT OF WHITE ROT OF ONION (*Allium cepa* L.)

Author: Maria Edna Tenório Nunes

Adviser: Prof. Dr. Hiroshi Kimati

SUMMARY

Onion white rot is a important disease of *Allium* plants, causing sometimes considerable losses on onion crop production at different commercial production areas in the world.

The capacity of the causal agent to remain in the soil for several years, despite of the absence of hosts plants, favoured by the production of resting structures, the sclerotia, is one of the principal causes that carries out the difficulty to reach highly satisfactory levels of disease control.

Aiming to obtain dates about new alternatives for white rot control, the present work involved the study of soil solarization and selection of microorganisms antagonics to the pathogen *in vitro*.

The obtainment of possible antagonics from

soil cultivated with onion was realized by the bait technic, wich was very efficient in seletive isolation of these microorganisms.

The soil solarization involved the test of two kinds of plastic films on soil mulching: transparent and black, 50 um and 30 um thickness, respectively. A positive effect of soil solarization was observed on the control of the disease in naturally infested soil, demonstrated essentially by the delay of simptoms development on plants.

The soil mulching with transparent plastic film resulted in better reduction on the percentage of plants killed or affected by white rot, whit regard to black plastic film.

1. INTRODUÇÃO

A podridão branca, causada pelo fungo *Sclerotium cepivorum* Berk., afeta várias plantas do gênero *Allium*, como alho, cebola, cebolinha e alho porró. Na cultura do alho é uma das mais importantes doenças, sendo de ocorrência generalizada nas regiões serranas dos Estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul. Em Minas Gerais passou a ser um fator limitante na manutenção do alho em várias regiões, causando perdas de até 100% em terrenos altamente infestados nos municípios de Alfenas, Paraguaçu, Ouro Fino, Campo do Meio e Campos Gerais (RESENDE, 1985).

Recentemente, tem sido verificada uma ocorrência do problema em plantações de cebola em municípios produtores do Estado de São Paulo, como São José do Rio Pardo, fato que tem chamado a atenção para as perdas que isto significa para a cultura (NUNES & FERREIRA, 1989).

Para o controle da podridão branca ainda não foram desenvolvidos métodos altamente satisfatórios, tanto do ponto de vista fitopatológico quanto do ponto de vista econômico.

Alguns métodos recomendados podem minimizar o problema, dentre os quais podem ser citados: sementeiras e

viveiros feitos em solos isentos do patógeno, destruição e queima de restos culturais, rotação de culturas, inundação do solo no início ou final da época chuvosa, uso de mudas e bulbos sadios e tratamento de áreas infestadas com fungicidas.

O uso de antagonistas para o controle de *Sclerotium cepivorum* tem sido estudado, apresentando resultados promissores em condições de casa-de-vegetação e campo (ADAMS & AYRES, 1981; UTKEDE & RAHE, 1980; UTKEDE & RAHE, 1983; ADAMS, 1987).

A técnica da solarização desenvolvida por KATAN *et alii* (1976) em Israel para o controle de uma variedade de patógenos do solo, pragas e plantas daninhas, tem se mostrado efetiva no controle de patógenos da cultura da cebola, como *Pyrenochaeta terrestris* (KATAN *et alii*, 1980) e *Sclerotium cepivorum* (PORTER & MERRIMAN, 1983a).

Assim sendo, o presente trabalho se propôs a avaliar a eficiência da solarização do solo no controle da podridão branca da cebola e do isolamento e seleção de microrganismos antagonísticos ao patógeno *in vitro*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos gerais sobre a doença

2.1.1. Histórico

A podridão branca, uma das mais sérias doenças para as culturas do alho e da cebola, foi descrita pela primeira vez por Berkeley, na Inglaterra, em 1841 (SCOTT, 1956). Desde então, tem sido constatada em muitos outros países (PAPAVISAS, 1972; UTKEDE & RAHE, 1978; GEORGY & COLEY-SMITH, 1982; LASA, 1984; COLEY-SMITH & ENTWISTLE, 1988).

No Brasil, foi assinalada pela primeira vez no Estado de São Paulo em 1942, por Drumond Gonçalves, incidindo sobre plantas originárias da região de Franca. A partir desta data a doença foi registrada sucessivamente nas mais diversas regiões paulistas e em outros Estados (CRUZ *et alii*, 1973). KIMATI (1980) destaca que a sua ocorrência tem sido mais frequente em regiões serranas dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, salientando que, particularmente para a cultura do alho, constituiu-se no principal problema fitopatológico em muitas dessas regiões.

As perdas ocasionadas pela podridão branca tem aumentado com os anos, chegando a 100% em terrenos altamente infestados dos municípios de Alfenas, Paraguaçu, Ouro Fino, Campo do Meio e Campos Gerais, tendo se tornado um fator limitante à manutenção do cultivo de alho nestas regiões (REZENDE, 1985).

Nos últimos anos tem sido verificada uma evolução do problema em plantações de cebola dos municípios produtores do estado de São Paulo, como São José do Rio Pardo, fato este que tem chamado a atenção com relação às perdas que isto pode significar para a cultura (NUNES & FERREIRA, 1989).

2.1.2. Etiologia e sintomatologia

O agente causal da podridão branca é um fungo imperfeito (Deuteromiceto), da Ordem *Mycelia sterilia*, denominado *Sclerotium cepivorum* Berk. É um fungo de solo, que pode atacar plantas do gênero *Allium* em qualquer estágio de desenvolvimento, desde que as condições ambientais lhe sejam favoráveis (KIMATI, 1980).

Este fungo não persiste no solo na forma de micélio saprofítico. O inóculo primário é constituído por escleródios formados a partir do micélio em bulbos infectados (SCOTT, 1956; COLEY-SMITH, 1960).

Os escleródios de *S. cepivorum* são normalmente descritos como sendo escuros, quase esféricos e com cerca de

200 - 500 um de diâmetro (COLEY-SMITH, 1959). Entretanto, GEORGY & COLEY-SMITH (1982) realizou a coleta de diferentes tipos de escleródios encontrados em associação com plantas apresentando sintomas de podridão branca e verificou que o fungo pode formar grandes massas de tecido estromático que podem estar sendo erroneamente associados a *Botrytis* spp.

Os escleródios permitem que *S. cepivorum* sobreviva no solo de um ano para outro, até novo plantio, ou mesmo por vários anos, na ausência de plantas hospedeiras (COLEY-SMITH, 1959). CROWE *et alii* (1980) encontraram populações de 0.01 a 1.0 escleródios/g de solo em áreas não cultivadas por espécies de *Allium* durante oito anos. Coley-Smith¹, citado por RESENDE & ZAMBOLIM (1987) vem mantendo em Hull, Reino Unido, estudos sobre a sobrevivência deste fungo. Dados de recuperação de escleródios têm mostrado que há pouco acréscimo na população de escleródios no solo, 15 anos após terem sido incorporados ao mesmo, mas decorrido este tempo ainda recuperou-se 90% dos escleródios e praticamente todos estavam viáveis.

Existem relatos de falhas na capacidade dos escleródios em manterem-se por períodos tão longos no solo, mas a maioria das evidências disponíveis sugerem que esta característica é bastante usual, enquanto o decréscimo rápido da população é algo excepcional (COLEY-SMITH, 1990).

¹ COLEY-SMITH, J.R. - Integrated control of *Sclerotium cepivorum*. In: Proceedings of the 2nd. International Workshop on *Allium* white rot, Beltsville, p. 87-98, 1983.

Durante a sobrevivência os escleródios são mantidos em um estágio inativo pela influência fungistática do solo não estéril (COLEY-SMITH, 1960). Eles têm sua dormência quebrada como uma resposta à presença de certas espécies de *Allium* (COLEY-SMITH, 1960; ESLER & COLEY-SMITH, 1983; SOMERVILLE, 1987), a sulfóxidos de S-alquenil-L-cisteína produzidos por estas plantas e a produtos da quebra destes sulfóxidos (COLEY-SMITH *et alii*, 1987). Tais produtos, particularmente dialil dissulfidas, mostram-se promissores no controle da podridão branca pelo estímulo à germinação dos escleródios e sua morte, na ausência de plantas hospedeiras (MERRIMAN *et alii*, 1981; COLEY-SMITH, 1990).

Sclerotium cepivorum dissemina-se mais rapidamente entre plantas que tem suas raízes em contato, do que entre plantas separadas. A disseminação planta-a-plantas é tanto menor quanto maior a distância entre elas. O fungo invade os bulbos através das raízes e a disseminação entre as plantas é prevenida pelo não contato entre suas raízes (SCOTT, 1956). A disseminação pode dar-se ainda através de mudas infectadas, solo e água contaminados, implementos agrícolas, animais e o próprio homem (AGRIOS, 1989; KIMATI, 1980).

Com relação às condições favoráveis à doença, alguns autores constataram que estão em solos com temperaturas entre 10 e 20°C e uma umidade em torno de 40% da capacidade de campo, sendo então mais severa em solos

altos, bem drenados e não irrigados do que em baixadas úmidas. Por outro lado, experimentos realizados em Amarantina (MG) revelaram uma maior severidade da doença nas baixadas úmidas, sendo que o excesso de irrigação contribuiu para o progresso da doença (JACCOUD FILHO *et alii*, 1985).

Sclerotium cepivorum é geralmente considerado como sendo patógeno específico de plantas de *Allium* em condições naturais e há poucos relatos dele infectando outras plantas que não sejam deste gênero (ESLER & COLEY-SMITH, 1984).

A podridão branca manifesta - se principalmente no campo, sendo seus sintomas caracterizados por bulbos com uma podridão basal seca recoberta por um crescimento micelial branco. As folhas das plantas afetadas decompõem-se na base, amarelecem, murcham e caem. Sobre o bolor branco inicial, aparecem com o tempo um grande número de corpúsculos pretos, os escleródios (KIMATI, 1980).

2.1.3. Controle

Ainda não foram encontradas medidas de controle para a podridão branca que tenham atingido níveis altamente satisfatórios. Em virtude da difícil erradicação do patógeno em áreas já infestadas, o uso de práticas que visam a não introdução da mesma em novas áreas é a medida mais eficiente.

A rotação de culturas, um método normalmente

eficiente para o controle de patógenos do solo, não é viável para o controle da podridão branca, uma vez que o fungo agente causal pode sobreviver no solo por longos períodos mesmo na ausência de plantas hospedeiras (COLEY-SMITH, 1959; CROWE *et alii* 1980; COLEY-SMITH, 1990).

O uso de fungicidas tem apresentado alguma eficiência no controle desta doença. Um dos métodos químicos de maior sucesso usado na cultura da cebola é o desenvolvido por ENTWISTLE & MUNASHINGUE (1980), que envolve o uso de iprodione aplicados às sementes e como rega na região do colo das plantas. No Brasil, tem-se recomendado o tratamento de solo, mudas ou bulbilhos, no caso de alho, com fungicidas como iprodione, PCNB e vinclozolina (KIMATI *et alii*, 1986; SINIGAGLIA *et alii*, 1986; CRUZ FILHO *et alii*, 1985). Em trabalho visando verificar a eficiência de fungicidas no controle da podridão branca do alho RESENDE *et alii* (1987) demonstraram que a eficiência dos fungicidas dependeu do nível de escleródios de *S. cepivorum* presentes no solo. Nas áreas com densidades de inóculo maiores que 0,199 escleródios/g de solo seco, para se obter o melhor controle da doença foi necessário fazer a associação dos tratamentos de bulbilhos e do solo com fungicida iprodione, enquanto em áreas com populações menores do patógeno apenas o tratamento de bulbilhos foi suficiente.

A resistência de *S. cepivorum* aos produtos empregados no controle da podridão branca ainda não foi verificada a nível de campo, mas o fungo tem potencial para

desenvolver resistência a fungicidas como os dicarboximidas, conforme demonstraram LITTLE & RAHE (1984).

Com relação à resistência das plantas à doença, muito pouco tem sido conseguido. Alguns autores afirmam que existem grandes diferenças na suscetibilidade das diferentes variedades de cebola (UTKEDE & RAHE, 1978), enquanto que outros encontraram pouca ou nenhuma diferença (COLEY-SMITH & ESLER, 1983). O controle da podridão branca por meio de resistência de plantas ou pela falta de habilidade das mesmas em estimular a germinação dos escleródios do fungo parece ser uma possibilidade muito remota até o presente momento (COLEY-SMITH, 1990).

Perspectivas futuras para o controle desta doença incluem o controle biológico, solarização do solo e uso de estimulantes para a germinação de escleródios. O controle biológico tem sido relatado em condições de laboratório, casa-de-vegetação e campo. Dentre os antagonistas que tem demonstrado bom potencial incluem-se *Bacillus subtilis*, *Coniothyrium minitans* e *Sporidesmium sclerotivorum* (AHMED & THIBE, 1977; UTKED & RAHE, 1980; ADAMS & AYRES, 1980).

A solarização do solo, método desenvolvido em Israel (KATAN, 1981), tem se demonstrado promissor para o controle da podridão branca. Reduções nas populações de escleródios de *S. cepivorum* tem sido conseguidas com este método na Austrália (PORTER & MERRIMAN, 1983) e Egito, embora estas reduções nem sempre resultem em aumentos de

produção para as culturas (COLEY-SMITH, 1990).

2.2. Solarização no controle de patógenos do solo

Através da cobertura do solo com plástico transparente na estação quente do ano, antes do plantio, um grupo de pesquisadores de Israel desenvolveu uma forma de aquecimento solar do solo para sua desinfestação (KATAN *et alii*, 1976). Esta técnica visa erradicar ou reduzir o inóculo existente no solo, antes do plantio. O filme plástico deixado sobre o solo serve como uma armadilha para capturar a energia solar e transmití-la ao solo. Assim, este método combina o princípio do calor como agente germicida com o do aquecimento do solo (KATAN, 1983).

Vários termos têm sido usados para descrever este método, como: aquecimento solar, solarização do solo, cobertura plastica do solo ou cobertura com polietileno ("tarping" ou "mulching" em inglês), desinfestação solar do solo. Desde que este método envolve repetidos aquecimentos diários do solo, a temperaturas medianas, o termo pasteurização solar é também justificado (KATAN, 1981).

Algumas condições são necessárias para que ocorra eficiência do método de solarização (KATAN, 1983): a) a cobertura do solo deve ser feita durante períodos de mais altas temperaturas e mais intensa irradiação solar; b) o solo deve ser mantido úmido para aumentar a sensibilidade térmica das estruturas de resistência dos patógenos

presentes no solo e melhorar a condutividade térmica; c) é recomendado o uso de filmes plásticos o mais finos possível (20-50um de espessura) pois além de mais baratos são mais efetivos em transmitir ao solo a energia capturada; d) como as camadas superiores do solo são mais rápido e intensamente aquecidas em relação às inferiores, o período de cobertura do solo deve ser longo, geralmente quatro ou mais semanas, o suficiente para permitir um bom controle em todas as profundidades desejadas. Quanto maior o período de cobertura do solo, maiores as taxas de morte dos patógenos e mais profunda a efetividade da solarização (KATAN *et alii*, 1976; KATAN *et alii*, 1983; PULLMAN *et alii*, 1981).

Temperaturas máximas tipicamente encontradas em solos solarizados, onde o controle de patógenos e plantas daninhas foi obtido, ficaram nas faixas de 45-50°C e 38-40°C nas profundidades de 10 e 20 cm, respectivamente. As temperaturas em solos solarizados são 5-15°C maiores que aquelas encontradas em solos não solarizados (ELAD *et alii*, 1980; KATAN *et alii*, 1976; KATAN *et alii*, 1981; KATAN *et alii*, 1983; PULLMAN *et alii*, 1981; USMANI & GHAFAR, 1982; KATAN, 1991).

A eficiência da solarização tem sido verificada para muitos patógenos do solo, dentre os quais pode-se citar: *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (GREENBERGER *et alii*, 1987); *Verticillium dhaliae* (MOORMAN, 1982; PULLMAN, 1981; PULLMAN *et alii*, 1981; ASHWORT & GAONA, 1982; ELAD, 1980); *Fusarium*

oxysporum f.sp. *vasinfectum* (BEN-YEPHET *et alii*, 1987; KATAN *et alii*, 1983; BEN-YEPHET *et alii*, 1988); *Roselinia necatrix* (FREEMAN *et alii*, 1990); *Rhizoctonia solani* (BOLKAN *et alii*, 1974); *Plasmodiophora brassicae* (WHITE & BUCZACKI, 1979); *Macrophomina phaseolina* (MIHAIL, 1984). Plantas daninhas, ácaros e nematóides também podem ser controlados pela solarização do solo (GRINTEIN *et alii*, 1979; ABDEL-RAHIN *et alii*, 1988; KATAN, 1983).

Na cultura da cebola a solarização tem sido utilizada, mostrando-se eficiente contra alguns dos importantes patógenos que afetam esta cultura. RABNOWITCH *et alii* (1981) verificaram que este método era eficiente para o controle de raízes rosadas, causada pelo fungo *Pyrenochaeta terrestris*, além de levar a um aumento na produção da cultura. PORTER & MERRIMAN (1983a) verificaram que *Sclerotium cepivorum* estava entre os patógenos mais sensíveis às flutuações da temperatura do solo. A solarização eliminou, a uma profundidade de 5 cm, e reduziu, a uma profundidade de 15 cm, o número de escleródios viáveis do fungo no solo. O principal efeito deste método de controle sobre a podridão branca foi atrasar o início do desenvolvimento da doença na cultura em 50 dias. Entretanto, embora as produções obtidas nas parcelas solarizadas tenham sido maiores, a maioria das plantas foi afetada pela doença (PORTER & MERRIMAN, 1983b). Em função dos dados obtidos os autores acreditam que as possibilidades de se usar a solarização para o controle da podridão branca em cebola,

quando se trata de solos com altos índices de escleródios de *S. cepivorum* são menos promissores, salientando a necessidade da integração com outros métodos, como produtos químicos e antagonistas que restrinjam a disseminação do patógeno nas camadas superiores do solo ou no tecido do hospedeiro.

Os mecanismos envolvidos no controle de doenças por solarização são vários. O efeito mais pronunciado é físico, isto é, o aumento da temperatura do solo por várias horas durante o dia, durante o período da cobertura com o plástico. Entretanto, outros processos estão envolvidos, como mudança na população microbiana, mudança na composição química e estrutura física do solo, altos índices de umidade do solo obtidos pela cobertura plástica e mudanças na composição gasosa do solo (KATAN, 1991).

Com relação à morte térmica dos patógenos, alguns estudos investigando as relações tempo/temperatura e morte de patógenos tem mostrado que uma relação linear pode ser obtida quando se plotam os logaritmos dos números de propágulos sobreviventes no solo contra os tempos de exposição dos mesmos a uma dada temperatura (KATAN, 1991). PULLMAN et alii (1981) obtiveram uma relação linear negativa ao plotarem o logaritmo do tempo requerido para matar 90% dos propágulos de vários patógenos do solo contra a temperatura.

O estudo da sensibilidade térmica de um patógeno em incubadoras pode indicar a possibilidade de seu

controle pela solarização. Escleródios de *Verticillium dahliae*, por exemplo, sendo mais sensíveis a temperaturas elevadas que aqueles de *Sclerotium rolfsii*, são também mais facilmente controlados por solarização. Entretanto, deve-se ter cuidado ao interpretar-se o significado de curvas de mortalidade obtidas em laboratório (KATAN, 1983). A escolha de um inóculo adequado é crucial para se ter resultados expressivos. A sensibilidade térmica de estruturas de resistência de patógenos pode diferir quando estes estão no solo ou embebidos em água. Também é importante levar em conta o efeito cumulativo das flutuações na temperatura durante o dia, uma vez que os propágulos podem ser enfraquecidos por aquecimento subletal, que pode não refletir em uma redução na sua germinabilidade.

Processos microbianos induzidos pela solarização podem contribuir com o controle de doenças. Os mecanismos de controle biológico que podem ser criados ou estimulados pela solarização são (KATAN, 1981): a) redução no índice de doença por morte microbiana do patógeno enfraquecido por aquecimento subletal, anulamento parcial ou completo da fugistase e subsequente lise dos propágulos em germinação, parasitismo ou lise dos propágulos por antagonistas estimulados pela solarização; b) redução no potencial do inóculo devido à antibiose ou competição favorecida pela solarização; c) diminuição da capacidade competitiva saprofítica do patógeno, na ausência do hospedeiro, devido à antibiose ou competição; d) supressão

do inóculo introduzido no solo depois da solarização; e) efeito no hospedeiro devido à proteção cruzada.

O antagonismo pode ser aumentado se propágulos do patógeno são enfraquecidos por aquecimento subletal e se tornam vulneráveis à atividade microbiana no solo. Escleródios de *Sclerotium rolfsii* tiveram um aumento na liberação de compostos orgânicos solúveis em água, sofreram uma maior colonização microbiana e enfrentaram um aumento na frequência de rachaduras na sua superfície quando submetidos a aquecimento subletal (Lifshitz et alii², citados por KATAN, 1991).

O efeito do aquecimento subletal na sobrevivência de *Armillaria mellea* foi claramente demonstrado por MUNNECKE et alii (1976). Menor tempo e temperaturas mais baixas foram requeridas para ocorrer a morte indireta do patógeno do que para morte direta. A 41°C os tempos de exposição para morte direta e indireta foram de 4-7 horas e 0.5-1 hora, respectivamente. *Trichoderma* spp. foram os colonizadores dominantes nas raízes de plantas submetidas ao aquecimento.

Conídios e conidióforos de *Fusarium oxysporum* f.sp *niveum* aquecidos a uma temperatura subletal de 38-42°C sofreram reduções de 0-33 % na sua viabilidade, ocorrendo também um enfraquecimento dos propágulos sobreviventes

² LIFSHITZ, R., TABACHNIK, M., KATAN, J., CHET, J. - The effect of subletal heating on sclerotia of *Sclerotium rolfsii* - Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, v.29, p.1607-1610, 1983.

(KATAN, 1991).

Estudos tem mostrado que os solos solarizados tornam-se hostis ou menos receptivos à reinfestação por patógenos. Isto pode ser visto como uma indução à supressividade (GREENBERGER *et alii*, 1987). Esta é uma forte diferença entre a solarização e outros métodos de desinfestação do solo, mais drásticos, que podem levar à criação de "ilhas" de reduzida atividade biológica no solo, que são facilmente reinfestadas por patógenos (KATAN, 1981). Para *Rhizoctonia solani* observou-se uma severa reinfestação do solo quando o mesmo foi desinfestado por aquecimento artificial a 80-100°C, enquanto tratamentos do solo a temperaturas mais baixas (50-60°C) reduziram a reinfestação (OLSEN & BAKER, 1968).

Estes dados estão relacionados ao fato de que os patógenos são menos resistentes ao calor que muitos saprófitas e antagonistas, incluindo *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* (BAKER & COOK, 1974; MUNNEKE *et alii*, 1976; OLSEN & BAKER, 1968). A solarização envolve temperaturas menores que a desinfestação do solo por ar quente, diminuindo as chances de criação de vácuo biológico no solo. Entretanto, os possíveis efeitos detrimenais sobre os antagonistas não devem ser excluídos (KATAN, 1981). Outro ponto favorável do aquecimento do solo a temperaturas mais amenas, conseguido com a solarização, é que a liberação de manganês, causando fitotoxicidade, muito comum em solos tratados com altas temperaturas, não ocorre ou ao menos

ainda não foi verificado nos solos solarizados (KATAN,1983).

O aumento no crescimento de plantas em solos tratados por solarização também tem sido observado para algumas culturas (CHEN & KATAN,1980; STAPLETON & DEVAY, 1982). Este fenômeno já havia sido verificado tanto em solos aquecidos artificialmente como naqueles fumigados. Os mecanismos que podem explicar este fato são químicos (liberação de nutrientes minerais e fatores de crescimento, nulificação de toxinas) ou biológicos (eliminação de patógenos secundários ou desconhecidos, estímulo de microrganismos benéficos).

A solarização tem sido investigada em cerca de 40 países e em alguns deles, como Israel, Itália, Japão, Grécia, Iraque e Estados Unidos é utilizada comercialmente por produtores para diferentes culturas.

2.3. Obtenção de microrganismos antagônicos para o controle de patógenos do solo

2.3.1. Isolamento de antagonistas potenciais

Num programa de controle biológico de doenças de plantas, etapas cruciais, que determinam as chances de seu sucesso, são o isolamento e seleção de microrganismos antagonistas. Muitas vezes podemos descartar um antagonista potencial ou selecionar um não antagonista por erros na

metodologia relacionados com o isolamento e seleção dos mesmos (ANDREWS, 1985).

Devido ao tempo e custos normalmente requeridos para a realização de ensaios em campo, há necessidade de se estabelecer métodos eficientes para conseguirmos obter microrganismos com boa eficiência no campo, através de testes de laboratório ou casa-de-vegetação.

As bactérias da rizosfera de plantas que tem a capacidade de prover o controle biológico de patógenos do solo compreendem menos de 10% da população total de bactérias do solo (SCHOROTH & HANCOCK, 1981). As chances de selecionar microrganismos eficientes podem ser melhoradas inicialmente pelo isolamento a partir do mesmo ambiente onde estes serão utilizados, por exemplo, selecionando da rizosfera de ervilha se o patógeno causa podridão de raízes desta cultura (WEHER, 1988). Isolamento de bactérias antagonistas a partir de solos supressivos pode aumentar ainda mais as chances de se encontrar organismos eficientes (COOK & BAKER, 1983). Os mesmos autores sugerem que os antagonistas sejam procurados em áreas onde a doença causada por determinado patógeno não ocorre ou tem diminuído sua ocorrência, ou não pode desenvolver-se apesar da presença de hospedeiros suscetíveis.

Vários métodos tem sido utilizados para se fazer o isolamento de microrganismos úteis aos programas de controle biológico de doenças. Entre estes podemos citar:

plaqueamento de misturas de suspensões de populações de microrganismos em meio agarizado contido em placas de Petri, comprovando-se a atividade antagonista pela formação de zonas de inibição; plaqueamento de fragmentos ou partes de plantas (BETTIOL, 1988); utilização de meios seletivos específicos para determinados grupos de microrganismos, como o meio de Martin modificado, proposto por HOMECHIN (1987) para o isolamento de *Trichoderma* spp.

GHINI & KIMATI (1989) apresentaram um método de iscas para obtenção de isolados de *Trichoderma* antagônicos a *Botrytis cinerea*, onde sementes de trigo autoclavadas eram colonizadas por *B. cinerea* e depois incubadas a 20°C em solo coletado de diferentes localidades produtoras de morango, contido em placas de Petri, por um período de 48 horas. Após este período, as sementes eram lavadas em água corrente e plaqueadas em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) por 1 semana e a uma temperatura de 20°C. As sementes eram, então, observadas sob microscópio estereoscópico e quando estruturas típicas de *Trichoderma* eram observadas estas eram transferidas para placas de Petri contendo BDA. O método de iscas assim desenvolvido foi altamente eficiente no isolamento do antagonista, conseguindo-se uma maior porcentagem de isolados quando comparado com o uso de sementes de testemunhas, que não eram colonizadas por *Botrytis cinerea* antes de serem colocadas no solo.

O isolamento de antagonistas a partir de

estruturas do patógeno é outro método que vem sendo utilizado. UTKEDE & RAHE (1980) e UTKEDE & RAHE (1983) isolaram *Bacillus subtilis* e *Penicillium nigricans* antagônicos a *Sclerotium cepivorum*, agente causal da podridão branca da cebola, através do plaqueamento de escleródios do patógeno em meio de cultura BDA. Esta metodologia tem sido eficiente no isolamento de microrganismos com potencial antagônico a diversos patógenos produtores de escleródios, como por exemplo: *Coniothyrium minitans* e *Bacillus subtilis* contra *Sclerotinia sclerotivorum* (TRUTMANN *et alii*, 1980; ZAZZERINI & TOSI, 1985); *Sporidesmium sclerotiorum* contra *Sclerotinia minor* (ADAMS & AYRES, 1981).

2.3.2. Seleção dos antagonistas através de testes *in vitro*

Os testes *in vitro* de seleção de microrganismos com potencial antagônico contra patógenos de plantas incluem, entre outras técnicas, a cultura pareada de antagonistas e patógenos em meios agarizados contidos em placas de Petri, exame microscópico da interação dos microrganismos crescendo sobre folhas destacadas ou fragmentos do tecido hospedeiro, ou ainda sobre lâminas de microscopia recobertas com meio agarizado (ANDREWS, 1985).

O método da cultura dupla ou cultura pareada em placas de Petri é o mais comumente utilizado e consiste

basicamente na colocação do antagonista sobre o meio de cultura, antes ou depois do patógeno, e a observação da formação de zonas de inibição entre as colônias que se desenvolverem ou o parasitismo entre elas. Antagonistas eficientes contra diversos patógenos foram selecionados através deste método (BETTIOL, 1988; ALVES *et alii*, 1990; NUNES *et alii*, 1986 ab; UTKEDE & RAHE, 1980; UTKEDE & RAHE, 1983).

A avaliação em lâminas de microscopia com meio agarizado é utilizada principalmente para verificar o efeito dos antagonistas sobre a germinação de esporos dos patógenos e interações entre hifas, para comprovar o parasitismo (MORGAN, 1963; ANDREWS *et alii*, 1983).

O uso de discos de folhas ou folhas destacadas inoculadas com o patógeno e os antagonistas é outra maneira de se efetuar a seleção de microrganismos antagonistas *in vitro*, importante principalmente para o caso de patógenos que são parasitas obrigados. CENTURION & KIMATI (1991 ab) utilizaram esta metodologia, inoculando folhas destacadas de feijoeiro com *Uromyces phaseoli* e bactérias antagonistas dos gêneros *Bacillus*, *Artrobacter* e *Lacillus*, verificando uma boa eficiência do método na indicação do potencial dos microrganismos em controlar a ferrugem do feijoeiro.

Embora muitas vezes não haja correlação significativa entre o antagonismo demonstrado *in vitro* e a efetividade em campo, existem razões para incluir os testes laboratoriais em processos de seleção de microrganismos com

potencial antagônico para o controle biológico de doenças de planta, destacando-se os fatos de que os ensaios *in vitro* dão informações sobre o modo de ação dos antagonistas e são uma maneira conveniente de se comparar numerosos isolados (ANDREWS, 1985).

Em função dessa falta de correlação, alguns ensaios *in vitro* tem sido modificados para simular mais estreitamente as condições naturais. RHODES *et alii* (1987) desenvolveram um teste para selecionar agentes de biocontrole contra patógenos da batata onde antagonistas e patógenos são co-inoculados em pedaços de batata e o nível de apodrecimento é comparado com aquele causado pelo patógeno sozinho. RANDHAWA & SCHAAD (1985) desenvolveram um bioensaio com plântulas que permite avaliar antagonistas a fungos e bactérias patogênicos a raízes, em placas de Petri.

A coincidência entre a efetividade *in vitro* e *in vivo* ocorre. Isolados de *Bacillus subtilis* inibiram *Sclerotium cepivorum* *in vitro*, suprimiram a ocorrência da podridão branca em cebola no campo e levaram a um aumento na emergência de plantas e na produção (UTKEDE & RAHE, 1983).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Determinação do número de escleródios no solo

Para se determinar a intensidade de infestação do solo por *Sclerotium cepivorum* na área utilizada para a realização do ensaio de solarização, realizou-se a extração e contagem do número de escleródios por grama de solo, através de metodologia descrita por RESENDE & ZAMBOLIM (1986).

Foram retiradas ao acaso, de uma área de aproximadamente 0.5 ha ocupada com a cultura de cebola em anos anteriores, 5 amostras do solo a uma profundidade de 0-20 cm e em laboratório separaram-se 4 alíquotas de 25g de cada uma.

Cada alíquota foi agitada juntamente com 250 ml de água em um liquidificador à baixa rotação, por 30 segundos. Após, a suspensão aquosa resultante foi passada através de peneiras de 20 e 60 "mesh", descartando-se o líquido percolado na última peneira.

Ao material que havia ficado no fundo do liquidificador, foram adicionados 50 ml de água, agitando-se manualmente e repetindo-se as operações de peneiramento.

Este procedimento foi realizado por 3 vezes consecutivas.

Posteriormente, todo o material acumulado na peneira de 60 mesh foi lavado sob água corrente por 3 minutos e coletado, com o auxílio de jatos de água provenientes de uma piseta, num disco de papel de filtro colocado sobre uma peneira de 20 mesh. O papel de filtro foi posto para secar em condições ambientes por 24 horas. Após, o material nele presente foi submetido a um peneiramento a seco em peneira de 60 mesh e coletado em placas de Petri.

Sob microscópio estereoscópico e com o auxílio de uma alça de repicagem, realizou-se a separação dos escleródios e resíduos, determinando-se o número de escleródios por grama de solo.

3.2. Efeito da solarização do solo na incidência de podridão branca em condições de campo

O ensaio foi desenvolvido no sítio Taquara Branca, município de São José do Rio Pardo, São Paulo, de fevereiro a agosto de 1989.

O delineamento experimental utilizado foi o fatorial, com 5 tratamentos (Tabela 1), 6 repetições e 4 épocas de avaliação.

Tabela 1: Tratamentos utilizados no controle da podridão branca da cebola através da solarização, Sítio Taquara Branca, São José do Rio Pardo, São Paulo.

TRATAMENTOS	PLÁSTICO		DURAÇÃO DA
	COR	ESPESSURA (μm)	COBERTURA (dias)
1. testemunha	-	-	-
2.	preto	30	15
3.	preto	30	30
4.	transparente	50	15
5.	transparente	50	30

Foram utilizadas no presente trabalho lonas plásticas AGROPLAS transparente e preta, comercializadas pela Electro Plástico S/A, com 50 e 30 μm de espessura, respectivamente. A escolha das espessuras dos plásticos foi feita em função da disponibilidade das mesmas no mercado.

Para se avaliar o efeito da duração da cobertura do solo na eficiência do controle, efetuou-se a solarização por 15 e 30 dias para cada tipo de plástico utilizado.

Durante todo o período em que o solo esteve coberto, procurou-se mantê-lo úmido, através de irrigação por sulco, o que ajuda a aumentar a sensibilidade térmica dos escleródios e melhora a transmissibilidade térmica no solo (KATAN, 1981; USMANI & GHAFAR, 1982).

As repetições utilizadas neste ensaio foram constituídas, cada uma, de um canteiro com 4.0 m de

comprimento e 1.2 m de largura, com 3 linhas de plantio de 3.0 m cada, espaçadas de 0.3 m, totalizando uma área de 4,8 m² por parcela.

O plantio foi realizado manualmente através da semeadura direta dos canteiros, utilizando-se sementes da variedade Texas Grano, cobrindo-se com pó de serra após a semeadura. Após a emergência das plântulas foi feito um desbaste, deixando-se uma população de 20 plantas por metro linear ou 180 plantas por parcela. A adubação e demais tratamentos culturais utilizados foram os recomendados para a região (FERREIRA & CASTELLANE, sem data).

As avaliações foram realizadas aos 60, 90, 120 e 150 dias após o plantio, contando-se o número de plantas mortas pela podridão branca, sendo o resultado expresso como porcentagem de plantas mortas em relação ao número total de plantas na parcela.

3.3. Obtenção de isolados

3.3.1. Isolados de *Sclerotium cepivorum*

Os isolados de *Sclerotium cepivorum* utilizados neste trabalho foram obtidos a partir de plantas de cebola com sintomas de podridão branca, provenientes de São José do Rio Pardo, São Paulo.

Após a desinfestação superficial dos escleródios do fungo presentes sobre os bulbos infectados,

realizada por imersão dos mesmos em solução de hipoclorito de sódio com 1,5% de cloro ativo durante 3 minutos (RESENDE & ZAMBOLIM, 1986), efetuou-se a transferência destes escleródios para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar). As placas foram mantidas no escuro a uma temperatura de 20°C.

Os isolados obtidos foram conservados em tubos de ensaio contendo BDA, mantidos em geladeira, a uma temperatura de 4 - 5 °C, ou em vidros com água destilada esterilizada, segundo o método de CASTELLANI para conservação de fungos (FIGUEIREDO & PIMENTEL, 1975).

3.3.2. Isolados de microrganismos antagônicos

Para o isolamento de microrganismos antagônicos a *S. cepivorum* utilizou-se o método de iscas descrito por GHINI *et alii* (1987). Sementes de trigo foram colocadas em Erlenmeyer de 250 ml, juntamente com água destilada e autoclavadas a 1 atm de pressão durante 20 minutos, por 2 dias consecutivos. Para se verificar o efeito da quantidade de água destilada adicionada às sementes sobre a aplicabilidade e praticidade do método de iscas, foram preparados frascos Erlenmeyer contendo sementes de trigo e água nas proporções de 1:0; 1:0.5; 1:1 e 1:2 v/v.

Após a autoclavagem e resfriamento das sementes, efetuou-se a inoculação das mesmas, colocando-se 4 discos de 0.5 cm de colônia de *Sclerotium cepivorum* em

cada Erlenmeyer. Os frascos foram mantidos em estufas de cultivo a 20°C, por um período de 10-15 dias, agitando-se diariamente os mesmos para homogeneizar o contato do fungo com as sementes.

Amostras de solo sob cultura de cebola foram obtidas em três municípios do Estado de São Paulo: Monte Alto, São José do Rio Pardo e Piracicaba. Após prévia homogeneização e peneiramento das mesmas, alíquotas de 20g foram retiradas de cada amostra, divididas em 2, sendo uma parte colocada em placa de plástico e umidecida com cerca de 5 ml de água destilada esterilizada.

Em cada placa foram colocadas 10 sementes de trigo onde o micélio de *S. cepivorum* desenvolvia-se vigorosamente, constituindo-se assim em iscas para o isolamento seletivo de microrganismos antagônicos. Após a semeadura, cobriu-se as sementes com o restante da alíquota de solo, colocando-se mais 5 ml de água destilada.

Foram também preparadas placas testemunhas, onde eram colocadas sementes de trigo não inoculadas com o patógeno, procurando-se verificar assim a eficiência do método de iscas no isolamento de microrganismos antagônicos a *S. cepivorum*.

As sementes foram mantidas nas placas com solo por um período de 48 horas, após o qual foram lavadas com água destilada esterilizada e colocadas em placas de Petri contendo meio de cultura adequado.

Objetivando-se obter bactérias antagonistas a

S. cepivorum, utilizou-se no isolamento destes organismos o meio NAY (extrato de levedura-nutriente ágar) com a seguinte constituição:

Peptona.....	5g
Extrato de carne.....	3g
NaCl.....	8g
Extrato de levedura.....	1g
Ágar.....	20g
Água destilada.....	1000ml

Após a semeadura com as iscas, as placas foram mantidas a 28°C, no escuro, por 3 a 5 dias, quando então os microrganismos desenvolvidos sobre ou ao redor das sementes foram transferidos para tubos de ensaio contendo o meio NAY e conservados em geladeira, a uma temperatura de 4-5 °C.

Durante o isolamento das bactérias observou-se em 2 placas o crescimento do fungo *Trichoderma spp* sobre as iscas. O fungo foi identificado com base em BARNET & HUNTER (1972). Procedeu-se a transferência de esporos e micélio do fungo para placas de Petri contendo meio de cultura BDA e, após o desenvolvimento e purificação das colônias, foi feita a transferência de discos das mesmas com 0.5 cm de diâmetro para tubos de ensaio contendo BDA ou vidros contendo água destilada esterilizada, com posterior armazenamento em geladeira, a uma temperatura de 4°C.

3.4. Testes de antagonismo

Os microrganismos obtidos foram testados *in vitro* quanto à sua capacidade em inibir o crescimento de *S. cepivorum* ou atividade como hiperparasita, através da técnica do pareamento das culturas do patógeno e do antagônico em meio de cultura. Nas extremidades de placas de Petri contendo meio de cultura BDA foram colocados discos de colônia de *S. cepivorum* com 0,5 cm de diâmetro. Do lado oposto das placas, distanciadas 7 cm do disco de colônia do patógeno, foram feitas pequenas estrias com células de colônias de bactérias com no máximo 48 horas de idade. No caso de isolados de fungos antagônicos, foram também utilizados discos de colônias, com 0.5 cm de diâmetro.

Para cada possível antagônico foram utilizadas 3 repetições (3 placas). Como testemunhas foram preparadas placas contendo apenas *S. cepivorum*. As placas foram mantidas em estufas incubadoras a 20°C, no escuro. A avaliação foi realizada após 1 semana ou quando as colônias do patógeno nas placas testemunhas haviam coberto toda a superfície do meio.

Foram consideradas antagonistas aquelas bactérias que levaram à formação de um halo de inibição do crescimento de *S. cepivorum*. No caso de fungos o antagonismo foi considerado positivo quando houve superposição das colônias do antagônico e do patógeno (hiperparasitismo).

3.5. Classificação das bactérias antagônicas de acordo com sua eficiência em inibir o crescimento micelial de *S. cepivorum* "in vitro"

Os testes foram realizados em placas de Petri contendo BDA, em cujos fundos foram marcados 2 pontos distanciados de 7 cm. Um disco de 0.5 cm de diâmetro de uma cultura de *S. cepivorum* foi transferido para um dos pontos e no outro foi feita uma pequena estria com células de colônia do isolado antagônico a ser testado, com no máximo 48 horas de incubação. Como testemunhas foram utilizadas placas apenas com *S. cepivorum*. Foram feitas 3 repetições (3 placas) para cada tratamento.

As placas foram incubadas no escuro, a 20°C e depois de 1 semana, ou quando as colônias do patógeno nas placas testemunhas haviam tomado toda a superfície do meio, procedeu-se a medição dos diâmetros das colônias de *S. cepivorum*, dos antagônicos e do halo de inibição formado, sempre na reta traçada entre os pontos marcados no fundo da placa.

Os isolados foram classificados de acordo com sua eficiência em causar antibiose a *S. cepivorum*, utilizando-se para esta classificação a porcentagem de inibição mostrada por cada isolado, que foi obtida através da fórmula:

$$\% \text{ INIBIÇÃO} = \frac{\text{Cresc. Test.} - \text{Cresc. Trat.}}{\text{Cresc. Test.}} \times 100$$

onde:

Cresc. Test. = diâmetro da colônia de *S. cepivorum* nas placas testemunha

Cresc. Trat. = diâmetro da colônia de *S. cepivorum* frente aos isolados antagônicos

3.6. Avaliação da sensibilidade dos fungos antagônicos a fungicidas.

Os fungos hiperparasitas selecionados foram testados quanto à sua sensibilidade a fungicidas normalmente empregados no controle da podridão branca e de outras doenças da cultura da cebola.

Os testes foram realizados "in vitro", em placas de Petri com meio de cultura BDA contendo os fungicidas à base de iprodione (Rovral) e vinclozolina (Ronilan) nas concentrações de 0, 0.1, 10, 100 e 1000 ppm. As diferentes concentrações dos fungicidas foram obtidas a partir da diluição em série de uma solução estoque em água esterilizada.

Em um Erlenmeyer contendo 100 ml de água foram colocadas 10 g do fungicida, agitando-se em seguida para obter uma solução homogênea (solução estoque). Uma alíquota de 1 ml desta solução foi retirada com uma pipeta e transferida para um Erlenmeyer contendo 100 ml de BDA autoclavado

e resfriado a 45°C, obtendo-se assim a concentração de 1000 ppm. Procedeu-se uma leve agitação circular do frasco para obter-se a homogeneização do fungicida com o meio, distribuindo-se, em seguida, em placas de Petri.

Para a obtenção da concentração de 100 ppm, 1 ml da solução estoque foi transferido para um tubo de ensaio contendo 9 ml de água esterilizada. Após homogeneização, 1 ml da solução do tubo foi retirada com uma pipeta e transferida para 100 ml de BDA. A diluição em série foi realizada desta forma até a obtenção de todas as concentrações de fungicidas desejadas.

Para a testemunha (0 ppm de fungicida) foi adicionada apenas água esterilizada (1 ml) ao meio de cultura, para evitar-se um possível efeito de diluição do meio quando da adição das suspensões dos fungicidas nos outros tratamentos.

Discos de colônia dos fungos antagonicos, com 0.5 cm de diâmetro, foram transferidos para o centro das placas contendo BDA mais fungicida, mantendo-se as mesmas em estufas de incubação a 20°C, no escuro. Para cada tratamento foram utilizadas 3 repetições (3 placas).

A avaliação foi realizada medindo-se o diâmetro das colônias, quando o fungo havia tomado toda a superfície do meio de cultura nas placas testemunhas. Tomou-se como base para a medição dos diâmetros das colônias uma reta traçada no fundo de cada placa, quando da montagem do ensaio.

4. RESULTADOS

4.1. Determinação do número de escleródios no solo

A tabela 2 reúne os resultados da extração e contagem de escleródios de *S. cepivorum* presentes no solo da área do sítio Taquara Branca (São José do Rio Pardo, São Paulo) onde foram realizados os ensaios de solarização para o controle da podridão branca. São apresentados os números obtidos em cada uma das repetições (alíquotas de 25 gramas) analisadas para cada amostra retirada do solo e os níveis médios de escleródios/g de solo correspondentes a estas amostras.

Os resultados mostram que a área em questão apresentava uma alta infestação pelo patógeno, tendo sido recuperados em todas as amostras números médios próximos ou até superiores a 1 escleródio/g de solo.

A análise estatística dos dados, realizada através do teste de Tukey, revelou que não houve diferença significativa aos níveis de 5% e 1% de probabilidade entre as médias obtidas para cada uma das amostras analisadas. Isto deixa claro que a distribuição espacial do patógeno no solo era também bastante homogênea.

Tabela 2: Número de escleródios de *Sclerotium cepivorum*/g de solo, detectados em área do sítio Taquara Branca, São José do Rio Pardo, São Paulo, 1989.

AMOSTRAS	REPETIÇÕES				MÉDIAS
	1	2	3	4	
MF1	1.12	0.48	0.84	1.68	1.03 a A ¹
MF2	1.24	0.04	1.20	0.72	0.80 a A
MF3	1.48	0.96	0.64	1.16	1.06 a A
MF4	1.28	1.00	0.80	1.12	1.05 a A
MF5	0.92	1.28	0.04	1.12	0.84 a A

¹ Médias seguidas de letras minúsculas e maiúsculas iguais não diferem estatisticamente aos níveis de 5% e 1% de probabilidade, respectivamente.

4.2. Efeito da solarização do solo sobre a incidência de podridão branca em condições de campo

Os dados referentes ao efeito da solarização do solo sobre a ocorrência de plantas de cebola mortas devido ao ataque de podridão branca são apresentados na tabela 3. Nesta tabela encontram-se as porcentagens de plantas mortas obtidas em cada um dos tratamentos, durante as avaliações realizadas aos 60, 90, 120 e 150 dias após o plantio, sendo estas porcentagens correspondentes a médias de 6 repetições (6 parcelas avaliadas). Encontram - se, ainda, as médias gerais alcançadas em cada tratamento, considerando - se os dados das 6 repetições e das 4 épocas

de avaliação.

A análise estatística dos dados, realizada através do teste de Tukey para médias dos tratamentos, revela que a solarização do solo teve efeito positivo na diminuição da porcentagem de plantas mortas pela ação de *S. cepivorum*. As parcelas testemunhas apresentaram índice médio geral de morte de plantas superior e significativamente diferente de todos os demais tratamentos, ao nível de 1% de probabilidade.

Na primeira avaliação, realizada aos 60 dias após o plantio da cebola, a porcentagem média de plantas mortas encontrada nas parcelas testemunhas foi semelhante apenas àquela encontrada com o tratamento T2 (cobertura do solo com plástico escuro por 15 dias), não apresentando diferença estatisticamente significativa. Os tratamentos T3, T4 e T5 foram superiores à testemunha e ao tratamento T2 sem, no entanto, diferirem entre si.

Aos 90 dias já foi possível observar - se uma melhor eficiência do tratamento T5, tendência esta que permaneceu até a última avaliação, aos 150 dias após o plantio.

Pode-se verificar através dos dados uma superioridade do plástico transparente quanto à eficiência de controlar a doença, em relação ao plástico escuro, o primeiro apresentando sempre índices menores de morte de plantas.

O tempo de cobertura do solo com os plásticos

também foi importante para a eficiência da solarização. As parcelas cobertas por um período maior (30 dias) apresentaram porcentagens médias de dano devido à doença menores e significativamente diferentes daquelas cobertas por apenas 15 dias, qualquer que tivesse sido o plástico utilizado (transparente ou escuro).

Tabela 3: Efeito da solarização, avaliado aos 60, 90, 120 e 150 dias após o plantio, sobre a incidência da podridão branca em cebola, em solo naturalmente infestado com *S. cepivorum* em São José do Rio Pardo, São Paulo, 1989.

TRAT.	% PLANTAS MORTAS ¹				MEDIA
	60	90	120	150	GERAL ²
1	22.58 A ³	26.74 A	91.68 A	93.39 A	62.03 A
2	19.95 A	22.46 AB	82.09 B	89.07 AB	54.57 B
3	10.87 B	15.51 BC	68.75 C	85.30 BC	43.87 C
4	9.40 B	11.86 CD	57.89 C	78.98 CD	37.16 D
5	5.26 B	8.10 D	40.45 D	69.20 D	27.14 E

¹Média de 6 dados (6 repetições)

²Média de 24 dados (6 repetições X 4 épocas de avaliação)

³Médias da mesma coluna seguidas por letras iguais não diferem significativamente ao nível de 1% de probabilidade

A evolução da doença com o tempo é mostrada na figura 1, onde foram plotadas as médias das porcentagens de plantas mortas obtidas em cada tratamento, nas diferentes

épocas de avaliação.

A Figura 1 mostra que o aumento da doença foi gradativo em todos os tratamentos, alcançando índices maiores à medida que o ciclo da cultura evoluía. O principal efeito da solarização sobre a podridão branca foi atrasar o início do seu desenvolvimento, o que pode ser verificado pelo estudo das curvas de evolução da doença mostradas nesta figura e das curvas obtidas com a regressão linear dos dados submetidos à transformação logística (figura 2).

4.3. Eficiência do método de iscas no isolamento de microrganismos antagônicos a *S. cepivorum*

A tabela 4 mostra os isolados de microrganismos antagônicos a *S. cepivorum* utilizados neste trabalho, a procedência das amostras e os métodos utilizados para o isolamento dos mesmos e a reação de cada um quanto à capacidade em causar inibição do crescimento micelial ou hiperparasitismo ao patógeno em meio de cultura B.D.A..

Foi obtido um total de 31 isolados de bactéria e 2 isolados de fungo. Destes, vinte e dois (20 de bactérias e 2 de fungo) foram eficientes em causar antibiose ou hiperparasitismo em relação a *S. cepivorum*. Dentre estes, aqueles de códigos AS26, AS27 e AS28 foram conseguidos em testes de seleção de antagônicos a *Helminthosporium oryzae* (NUNES *et alii*, 1986) e outro (AS20) crescia como contaminante em placas com fungos diversos, em

trabalhos realizados no Laboratório de Fitopatologia da ESALQ/USP em Piracicaba, São Paulo, sempre causando forte inibição do crescimento micelial desses fungos.

Figura 1: Evolução da ocorrência da podridão branca em plantio de cebola em solo naturalmente infestado e submetido a diferentes tratamentos de solarização, em São José do Rio Pardo, São Paulo, 1989.

Figura 2: Curvas obtidas a partir da regressão linear dos dados de porcentagem de morte de plantas em diferentes tratamentos de solarização.

EQUAÇÕES DE REGRESSÃO LINEAR OBTIDAS PARA CADA TRATAMENTO:

TESTEMUNHA : $Y = -0,2290 + 0,00837 x$

pl. preto/15 d : $Y = -0,3594 + 0,00858 x$

pl. preto/30 d : $Y = -0,4807 + 0,00887 x$

pl. transp/15 d : $Y = -0,4641 + 0,00815 x$

pl. transp/15 d : $Y = -0,4486 + 0,007158 x$

Tabela 4: Efeito de isolados de bactérias (AS) e fungos (AST) antagônicos, sobre o crescimento micelial de *Sclerotium cepivorum* em meio de cultura BDA.

ISOLADO	PROCEDÊNCIA	MÉTODO DE ISOLAMENTO	REAÇÃO ¹
AS1	MONTE ALTO	ISCA	+
AS2	MONTE ALTO	ISCA	+
AS3	MONTE ALTO	ISCA	-
AS4	MONTE ALTO	ISCA/TESTEMUNHA	+
AS5	MONTE ALTO	ISCA	-
AS6	MONTE ALTO	ISCA/TESTEMUNHA	-
AS7	MONTE ALTO	ISCA/TESTEMUNHA	-
AS8	PIRACICABA	ISCA/TESTEMUNHA	-
AS9	RIO PARDO	ISCA	+
AS10	RIO PARDO	ISCA	+
AS11	RIO PARDO	ISCA	+
AS12	RIO PARDO	ISCA/TESTEMUNHA	+
AS13	RIO PARDO	ISCA	+
AS14	RIO PARDO	ISCA	+
AS15	RIO PARDO	ISCA/TESTEMUNHA	-
AS16	RIO PARDO	ISCA TESTEMUNHA	-
AS17	RIO PARDO	ISCA TESTEMUNHA	-
AS18	RIO PARDO	ISCA	+
AS19	PIRACICABA	ISCA	+
AS20	PIRACICABA	CONTAMINANTE	+
AS21	PIRACICABA	ISCA	+
AS22	PIRACICABA	ISCA	+
AS23	PIRACICABA	ISCA/TESTEMUNHA	+
AS24	PIRACICABA	ISCA	+
AS25	PIRACICABA	ISCA	+
AS26	PIRACICABA	ISOLADO/ARROZ	+
AS27	PIRACICABA	ISOLADO/ARROZ	+
AS28	PIRACICABA	ISOLADO/ARROZ	+
AS29	RIO PARDO	ISCA/TESTEMUNHA	-
AS30	RIO PARDO	ISCA/TESTEMUNHA	-
AS31	RIO PARDO	ISCA/TESTEMUNHA	-
AST1	RIO PARDO	ISCA	+
AST2	RIO PARDO	ISCA	+

¹o sinal + indica formação de halo de inibição e/ou hiperparasitismo

Verifica-se pelos dados que a maioria (68%)

dos microrganismos considerados antagônicos foram obtidos através do método de iscas, perfazendo 15 isolados num total de 22 que mostraram reação positiva de antagonismo a *S. cepivorum*. Dentre os isolados obtidos pelo método de iscas, apenas 2 não apresentaram a mesma capacidade.

Os microrganismos obtidos com as "iscas testemunhas" (sementes de trigo não inoculadas com *S. cepivorum*) foram, na sua maioria, incapazes de causar antibiose. De um total de 12 isolados obtidos desta forma, apenas 3 apresentaram reação positiva no teste de seleção de antagônicos.

Com relação ao efeito da quantidade de água sobre a aplicabilidade e praticidade do método de iscas para isolamento de microrganismos antagônicos, verificou-se uma maior eficiência da proporção 1:0.5 v/v de sementes de trigo e água, respectivamente. Quando se adicionou quantidades maiores de água (1:1.5 e 1:2 v/v) as sementes de trigo desintegraram-se com mais facilidade durante a autoclavagem. Com isto, à medida que o micélio de *S. cepivorum* crescia sobre as sementes após a inoculação das mesmas, formava-se uma massa compacta, dificultando a separação das sementes e sua utilização como iscas. No caso em que não foi adicionada água às sementes, verificou-se um crescimento mais lento do patógeno sobre as sementes. Enquanto nos demais tratamentos o fungo necessitava de 10 a 15 dias para tomar a superfície de todas as sementes de maneira uniforme, no tratamento sem adição de água foi necessário um período de 30 a 40 dias

para que o mesmo ocorresse.

4.4. Classificação das bactérias antagônicas de acordo com sua capacidade em inibir o crescimento micelial de *S. cepivorum* "in vitro".

Os vinte isolados de bactéria que apresentaram antibiose a *S. cepivorum* nos testes de antagonismo foram classificados em função da porcentagem de inibição que causavam ao crescimento micelial do patógeno. A tabela 5 mostra esta classificação, obtida após a análise estatística dos dados, realizada através do teste de Tukey.

Verificou-se que dentre os dez isolados mais eficientes, com porcentagens de inibição superiores a 50%, oito haviam sido obtidos pelo método de iscas (AS2, AS19, AS18, AS21, AS9, AS25, AS1 e AS22). Neste grupo dos mais eficientes encontravam - se ainda um isolado do trabalho com *H. oryzae* (AS26), com 59.25% de inibição, e o contaminante (AS20), que comprovou sua forte capacidade antagônica, demonstrada contra diversos fungos no laboratório, alcançando uma porcentagem de inibição do crescimento micelial de *S. cepivorum* de 62.57%, sendo o terceiro em ordem de eficiência.

Os três únicos isolados obtidos com as "iscas testemunhas" que mostraram reação positiva nos testes de seleção de antagônicos tiveram uma baixa eficiência

apresentando porcentagens de inibição de 25.12% (AS23), 21.39% (AS4) e 9.82% (AS12), este último sendo o menos eficiente de todos os isolados testados.

Tabela 5: Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Sclerotium cepivorum* frente a diferentes isolados de bactérias antagônicas.

ISOLADO	PROCEDÊNCIA	% DE INIBIÇÃO ¹		
AS2	MONTE ALTO (ISCA)	70.30	a	A ²
AS19	PIRACICABA (ISCA)	69.30	a	AB
AS20	PIRACICABA (CONTAMIN.)	62.57	ab	ABC
AS26	ISOLADO/ARROZ	59.25	abc	ABCD
AS18	RIO PARDO (ISCA)	57.33	bc	BCDE
AS21	PIRACICABA (ISCA)	56.97	bcd	BCDE
AS9	RIO PARDO (ISCA)	56.25	bcd	CDE
AS25	PIRACICABA (ISCA)	52.53	bcd	CDE
AS1	MONTE ALTO (ISCA)	52.20	bcd	CDE
AS22	PIRACICABA (ISCA)	50.73	cd	CDE
AS28	ISOLADO ARROZ	49.19	cd	DE
AS14	RIO PARDO (ISCA)	45.49	d	E
AS24	PIRACICABA (ISCA)	26.96	e	F
AS10	RIO PARDO (ISCA)	25.86	e	F
AS23	PIRACICABA (ISCA TEST.)	25.12	e	F
AS11	RIO PARDO (ISCA)	24.76	e	F
AS13	RIO PARDO (ISCA)	23.66	e	F
AS4	MONTE ALTO (ISCA TEST.)	21.39	e	F
AS27	ISOLADO ARROZ	18.84	e	FG
AS12	RIO PARDO (ISCA TEST.)	9.82	f	G

¹ Média de 3 repetições

² Médias seguidas por letras minúsculas e maiúsculas iguais não diferem significativamente aos níveis de 5% e 1%, respectivamente.

4.5. Avaliação da sensibilidade dos fungos antagônicos a fungicidas

Os dois isolados de *Trichoderma* sp obtidos foram testados com relação a sua sensibilidade a fungicidas e os dados deste ensaio são apresentados na tabela 6, que mostra os diâmetros médios das colônias em meio B.D.A. suplementado com os fungicidas Vinclozolin e Iprodione nas concentrações de 0, 0.1, 1, 10, 100 e 1000 ppm.

O crescimento dos dois isolados nas placas com meio de cultura contendo até 1 ppm de fungicida não diferenciaram da testemunha, para qualquer dos dois produtos utilizados.

O isolado T1 conseguiu desenvolver-se, sem diferir da testemunha, frente a 10 ppm dos fungicidas. Na concentração de 100 ppm também houve desenvolvimento da colônia, sendo este menor e estatisticamente diferente da testemunha. A 1000 ppm o fungo não foi capaz de desenvolver-se.

Para o isolado T2 o fungicida Vinclozolin teve efeito maior, inibindo totalmente o crescimento do fungo a partir da concentração de 10 ppm. O fungicida Iprodione nas concentrações de 0.1 a 100 ppm não impediu o crescimento de *Trichoderma*, sendo totalmente efetivo apenas a 1000ppm.

Tabela 6: Crescimento micelial de isolados de *Trichoderma* sp (T1 e T2) em meio de cultura B.D.A. contendo diferentes dosagens dos fungicidas Vinclozolin e Iprodione.

ISOLADOS	DOSAGENS (ppm)	DIÂMETRO DAS COLÔNIAS (CM) ¹	
		Vinclozolin	Iprodione
T1	0	9.0 a A	9.0 a A
	0.1	9.0 a A	9.0 a A
	1	9.0 a A	9.0 a A
	10	7.0 ab AB	6.8 ab AB
	100	3.7 b BC	3.5 bcBC
	1000	0.0 c C	0.0 c C
T2	0	9.0 a A	9.0 a A
	0.1	9.0 a A	9.0 a A
	1	9.0 a A	9.0 a A
	10	0.0 b B	5.0 b A
	100	0.0 b B	4.9 b A
	1000	0.0 b B	0.0 c B

¹ Média de 3 repetições

² Médias da mesma coluna seguidas por letras minúsculas e maiúsculas iguais não diferem estatisticamente aos níveis de 5% e 1% de probabilidade, respectivamente.

Para o isolado T2 o fungicida VINCLOZOLIN teve efeito maior, inibindo totalmente o crescimento do fungo a partir da concentração de 10 ppm. O fungicida Iprodione nas concentrações de 0.1 a 100 ppm não impediu o crescimento de *Trichoderma*, sendo totalmente efetivo apenas a 1000 ppm.

5. DISCUSSÃO

5.1. Determinação do número de escleródios no solo

Os resultados obtidos sobre o número de escleródios recuperados na área onde o ensaio de solarização foi realizado demonstram que o solo estava muito infestado pelo patógeno.

A densidade de escleródios de *S. cepivorum* presentes no solo que é necessária para provocar elevada incidência de podridão branca é geralmente baixa. Embora não existam muitos dados referentes à relação entre a densidade de inóculo e a ocorrência da doença em condições de campo, alguns trabalhos têm mostrado, em condições de casa de vegetação ou áreas artificialmente inoculadas, que pequeno número de escleródio é suficiente para promover a ocorrência de níveis muito próximos a 100% de doença. Na Califórnia, constatou-se que a ocorrência de podridão branca em alho na época da colheita atingia o nível de 100% quando a infestação do solo, realizada artificialmente, era de 0.1 escleródio/g de solo antes do plantio (CROWE *et alii*, 1980). Amostras de solo de outros quatro estados americanos apresentavam densidades de inóculo maiores quando a

ocorrência da doença era de 100%, chegando-se a extrair até 12.88 escleródios/g de solo em algumas amostras. Entretanto, a maioria das populações encontradas era inferior a 0.5 escleródio/g de solo seco (ADAMS, 1979).

Verifica-se então que a quantificação de escleródios presentes no solo, embora difícil, é de suma importância, uma vez que o inóculo inicial (população do patógeno no solo antes do plantio) pode estar altamente correlacionado com a ocorrência da doença na colheita (ADAMS, 1981). Pode-se inclusive estabelecer, a partir desta quantificação, classificações baseadas nos níveis relativos de infestação, úteis na tomada de decisão com relação à utilização da área para o plantio de espécies de *Allium* ou mesmo para adoção de medidas de controle da doença. RESENDE *et alii* estabeleceram uma classificação deste tipo, separando os níveis de infestação relativa em BAIXO, MÉDIO e ALTO, para áreas com populações de 0 a 0,0999, 0.1 a 0.799 e 0.8 a 6.399 escleródios/g de solo, respectivamente.

O histórico da área experimental utilizada no presente trabalho revelava que a ocorrência da podridão branca atingira níveis próximos ou iguais a 100% nos 2 anos que precederam a realização do ensaio³. A análise dos dados pode explicar este histórico, já que os níveis médios de escleródios encontrados nas amostras analisadas foram sempre

³ FERREIRA, M.D. - (Cooperativa Regional dos Cafeicultores em Guaxupé/Núcleo de São José do Rio Pardo, São Paulo) Comunicação Pessoal, 1988.

próximos ou até superiores a 1, sendo maiores que aqueles apresentados por ADAMS (1979) e CROWE *et alii* (1980) como precursores de uma ocorrência de 100% da doença. Estes números enquadram-se também no nível ALTO da classificação estabelecida por RESENDE (1986).

5.2. Efeito da solarização do solo sobre a incidência da podridão branca em condições de campo

No presente trabalho verificou - se que a solarização do solo foi efetiva no controle da podridão branca, tendo como principal efeito o atraso no início do desenvolvimento da doença. O controle não foi altamente efetivo, sendo que no final do ciclo da cultura todas as parcelas, tratadas ou não, apresentaram altos índices de morte de plantas pela ação de *S. cepivorum* (Tabela 3) e as plantas que ainda não haviam morrido estavam afetadas pelo patógeno. Tais resultados são concordantes com aqueles encontrados por PORTER & MERRIMAN (1983A), que verificou um atraso de 50 dias para o início do aparecimento da podridão branca em cebola, em solo artificialmente inoculado e submetido ao processo de solarização.

A ocorrência de índices altos de doença que foi verificada no presente trabalho, mesmo nas parcelas tratadas, não é anormal, tendo em vista os altos números de escleródios encontrados nas amostras de solo analisadas, retiradas antes da solarização. Pesquisas realizadas por

Hall & Somerville⁴, citados por RESENDE *et alii* (1987), demonstraram que a eficiência do controle da podridão branca é altamente dependente da densidade de inóculo presente no solo. Os autores afirmam que em solos muito infestados o controle não é eficiente. Do ponto de vista do controle químico desta doença, trabalhos tem demonstrado que a dosagem de fungicida requerida pode ser menor ou que tratamentos isolados de solo e de bulbilhos (no caso de alho) podem ser efetivos em áreas onde a infestação do solo é relativamente menor, o que não acontece em áreas altamente infestadas (CRUZ FILHO *et alii*, 1984; RESENDE *et alii*, 1987).

Com relação ao tipo de plástico utilizado, verificou-se que o transparente foi superior em eficiência quando comparado ao escuro (preto). Uma explicação para isto é o fato de o plástico transparente favorecer o "efeito estufa", transmitindo mais eficientemente o calor ao solo e diminuindo a evaporação do mesmo. Há que se ressaltar que embora tendo uma espessura maior que o plástico escuro, o que poderia interferir na transmissão do calor ao solo e consequentemente na eficiência da solarização (KATAN, 1980), o filme transparente ainda foi superior.

O tempo em que o solo esteve coberto com os plásticos também interferiu na eficiência do controle da

⁴ HALL, D.H., SOMERVILLE, P.A. - Effect of inoculum potential on control of white rot of onion by fungicides - In: Proceedings of the 2nd. International Workshop on Allium white rot, Beltsville, p.113-114, 1983.

podridão branca pela solarização, sendo que períodos maiores de cobertura (30 dias) propiciaram uma menor morte de plantas que períodos menores (15 dias). A taxa de morte de patógenos do solo e a eficiência do processo de solarização no controle de doenças por eles incitadas são tanto maiores quanto maior o tempo em que o solo permanece coberto, inclusive com aumento na profundidade do solo alcançada pelo tratamento (KATAN *et alii*, 1976; PULLMAN *et alii*, 1981; KATAN *et alii*, 1983).

Embora períodos maiores de cobertura sejam preferíveis para se conseguir o aumento das taxas de controle obtidas pela solarização, deve-se ter em mente que as áreas tratadas ficam impossibilitadas de serem cultivadas durante todo o tempo que dura o processo. Como em outras localidades, em São José do Rio Pardo é comum o plantio de outras culturas, como milho e cenoura, nas áreas destinadas à produção de cebola, durante o período da entressafra. Ressalta-se portanto a necessidade de estudar-se uma maior gama de durações de cobertura do solo, visando-se encontrar aquele que seja mais efetivo em termos de controle e que interfira menos nas programações anuais de cultivo das áreas tratadas.

5.3. Eficiência do método de iscas no isolamento de microrganismos antagônicos a *Sclerotium cepivorum*

O uso de iscas para o isolamento de microrganismos antagônicos a *S. cepivorum* mostrou-se eficiente, tendo sido conseguida uma maior porcentagem de organismos capazes de inibir o crescimento micelial do patógeno em meio de cultura, quando este método de isolamento foi utilizado. DHINGRA & SINCLAIR (1985) descrevem técnica semelhante, salientando que esta pode ser utilizada com eficiência para o isolamento de microrganismos com atividade lítica ou micoparasitas.

Segundo ANDREWS (1985) dois erros típicos e análogos às hipóteses consideradas nos testes estatísticos podem ser cometidos quando busca-se obter antagonistas em qualquer comunidade: um antagonista pode ser descartado ou um não antagonista pode ser retido. É sabido também que na rizosfera as bactérias que possuem habilidade para promover o controle biológico compreendem menos de 10% da população total de bactérias do solo (SCHOROTH & HANCOCK, 1981).

Há necessidade, portanto, de se estabelecer métodos de seleção que aumentem a chance de se encontrar organismos eficientes. A busca por melhores e mais eficazes métodos de isolamento é um primeiro e importante passo em direção a este objetivo.

O isolamento de microrganismos antagônicos a um determinado patógeno do solo a partir de solos

supressivos ou do mesmo ambiente onde estes antagonísticos serão utilizados (WEHER, 1988) são formas de se elevar a eficiência desta etapa num programa de controle biológico.

A metodologia utilizada no presente trabalho, que envolveu o uso de sementes de trigo inoculadas com *S. cepivorum*, teve efeito positivo no isolamento seletivo de antagonísticos a este patógeno. Quando foram utilizadas sementes não inoculadas, os microrganismos isolados, na sua maioria, não foram capazes de causar antibiose a *S. cepivorum* "in vitro".

A presença do micélio do patógeno sobre as sementes iscas pode ter agido de modo a favorecer aqueles microrganismos do solo capazes de antagonizar de alguma forma *S. cepivorum*, fazendo com que as populações destes antagonísticos aumentassem no solo e sobre as sementes, permitindo que o isolamento destes tivesse sido mais fácil, em detrimento daqueles agentes que estivessem no solo mas que não apresentassem qualquer atividade antagonística com relação ao patógeno em questão. Este resultado vem corroborar aqueles encontrados por GHINI & KIMATI (1989) que demonstraram ser o método de iscas efetivo na seleção de *Trichoderma* spp. antagonísticas a *Botrytis cinerea*, encontrando altas frequências do fungo antagonista sobre as sementes iscas, ao passo que as sementes testemunhas apresentaram frequências baixas, iguais a zero na sua maioria.

5.4. Classificação das bactérias antagônicas de acordo com sua capacidade em inibir o crescimento micelial de *S. cepivorum* "in vitro"

A comprovação da capacidade antagônica das bactérias isoladas e a classificação das mesmas de acordo com sua capacidade em inibir o crescimento micelial de *S. cepivorum* foram feitas com base em testes realizados "in vitro". Estes testes revelaram não só que o método de iscas foi eficiente para obtenção de um maior número de microrganismos com capacidade antagônica como também que aqueles isolados obtidos por este método constituíram a maioria entre aqueles que apresentaram porcentagens médias de inibição superiores a 50% (tabela 5).

Embora a antibiose demonstrada nos testes "in vitro" nem sempre esteja relacionada com o controle biológico em campo, algumas razões existem que justificam sua inclusão no processo de seleção de microrganismos antagônicos. Uma destas razões fundamenta-se no fato de que ensaios em laboratório podem dar indícios sobre o modo de antagonismo envolvido e sistemas que podem ser utilizados para melhor estudá-lo. Zonas de inibição do crescimento micelial demonstradas em meio de cultura, por exemplo, estão normalmente associadas com antibiose ou privação nutricional. Além disso, os testes "in vitro" são uma maneira conveniente de se comparar isolados, sendo um método rápido e que permite testar vários organismos de uma só vez

(ANDREWS, 1985).

Existem exemplos que mostram que a correlação entre os testes em laboratório e as avaliações em campo ocorre e é altamente positiva em alguns casos. A presença de zonas de inibição "in vitro" foi boa indicadora da performance de *Agrobacterium radiobacter* em relação ao controle de *A. tumefaciens* em pessegueiro (ALCONERO, 1980). *Cellulomonas flavigena*, *S. flavofulgini* e *Pseudomonas fluorescens*, que foram antagônicas a *Verticillium dahliae* "in vitro" reproduziram-se bem na rizosfera e superfície das raízes de batata, controlando o patógeno em vasos. Estes organismos também controlaram *V. dahliae* e aumentaram o crescimento de plantas e a produção de tubérculos de batata em solo de um campo naturalmente infestado pelo patógeno (WADI, 1985).

Com relação à podridão branca, dados promissores também têm sido encontrados e demonstram que a correlação entre os diferentes testes realizados durante a seleção para o controle biológico da doença é verdadeira. Isolados de *Bacillus subtilis* inibiram o crescimento de *S. cepivorum* "in vitro", suprimiram a incidência de podridão branca da cebola em campo e levaram a um aumento da emergência de plântulas e da produção (UTKEDE & RAHE, 1983).

Modificações nos ensaios "in vitro" tem sido feitas para melhor simular as condições naturais e com isto favorecer o isolamento de microrganismos mais eficientes para o controle biológico de doenças. RHODES et alii (1987)

desenvolveram um método onde antagonistas e patógenos da batata são co-inoculados em pedaços de batata e a mortalidade é comparada com aquela causada pelo patógeno inoculado isoladamente. RANDHAWA & SCHAAD (1985) desenvolveram um bioensaio que permite estudar antagonistas e fungos e bactérias patogênicos sobre raízes crescendo em placas de Petri.

O método de iscas utilizado no presente estudo pode ser considerado como uma modificação positiva dos métodos de isolamento e seleção de microrganismos antagônicos. A classificação das bactérias obtidas comprovou uma vez mais a eficiência deste método, já que os isolados que apresentaram maiores porcentagens de inibição do crescimento micelial de *S. cepivorum* foram, na sua maioria, obtidos a partir das sementes iscas. O micélio do patógeno sobre as sementes de trigo parece ter sido um fator importante no isolamento seletivo dos antagônicos, atuando possivelmente como um atrativo para estes organismos e com isso facilitando seu isolamento. Pode-se concluir com isto que este método pode ser incluído nos processos de obtenção e seleção de microrganismos eficientes para o controle biológico de patógenos do solo, por apresentar - se potencialmente capaz de elevar a eficiência destas etapas e, conseqüentemente, de todo o programa de controle biológico.

5.5. Avaliação da sensibilidade dos fungos antagônicos a fungicidas

Os dois isolados de *Trichoderma* spp. obtidos foram testados com relação à sua sensibilidade aos fungicidas a base de vinclozolin e iprodione, mostrando tolerância a estes produtos, uma vez que foram capazes de crescer até na concentração de 100 ppm destes produtos. A exceção que ocorreu foi do isolado T2 frente ao fungicida Ronilan (vinclozolin). O fungo não conseguiu crescer em meio de cultura com concentrações do fungicida maiores que 10 ppm, embora o crescimento não tenha diferenciado entre as dosagens de 0, 0.1 e 10 ppm.

Populações indígenas ou introduzidas de *Trichoderma* no solo são conhecidas por apresentarem maior tolerância a biocidas de amplo espectro e para colonizar mais rapidamente solos tratados, quando comparados com outros organismos do solo (MUNNECKE, 1972). Este fungo foi o recolonizador dominante em solo tratado com dissulfeto de carbono ou em solo tratado com formaldeído (EVANS, 1955).

Efeitos benéficos de alguns fungicidas sobre *Trichoderma* no solo têm sido demonstrados. DAVET (1981) confirmou tais efeitos sobre *T. harzianum* com relação ao fungicida Thiran, quando este era usado para o tratamento de sementes. A incorporação de metalaxyl a sementes de ervilha antes de tratá-las com *T. harzianum* aumentou a sobrevivência de conídios e também elevou o número de unidades formadoras

de colônias na rizosfera, quando comparado com o tratamento de sementes apenas com conídios do fungo antagônico (PAPAVIZAS, 1981).

A habilidade de isolados de fungos do gênero *Trichoderma* em proliferar em ambientes tratados com fungicidas é de especial interesse para os trabalhos com controle biológico e controle integrado de doenças de plantas, abrindo um novo horizonte que envolve a aplicação de doses subletais de pesticidas em associação com o antagônico. Trabalhos tem sido desenvolvidos no sentido de induzir resistência a diferentes fungicidas em isolados deste fungo que apresentam interesse para o controle biológico (PAPAVIZAS *et alii*, 1982; ABD-EL MOITY *et alii*, 1982).

O uso de *Bacillus subtilis* no tratamento de sementes em associação com o tratamento de solo com vinclozolin antes do plantio para o controle da podridão branca da cebola resultou em níveis de controle iguais ou maiores que aqueles apresentados com o fungicida isoladamente, sendo estes resultados obtidos em um ensaio em vasos e três ensaios de campo. Com relação ao fungicida a base de iprodione, os níveis de controle obtidos em cada tratamento foram semelhantes em campo, mas nos ensaios em vasos a combinação de tratamentos com bactérias e fungicidas foi menos efetiva que quando estes tratamentos foram realizados isoladamente (UTKEDE & RAHE, 1983).

A ocorrência de tolerância dos isolados de

Trichoderma obtidos no presente trabalho aos fungicidas a base de iprodione e vinclozolin é um fator importante que dá suporte para a intensificação de estudos visando a obtenção de um maior número de antagonistas com a mesma característica. A associação de controle biológico usando microrganismos antagônicos a fungicidas com o controle químico pode ser uma solução para o controle da podridão branca, que não encontra hoje nenhum método altamente eficaz. Além disso, a possibilidade de se poder utilizar dosagens menores de produtos químicos, quando em associação com os antagônicos, poderá ajudar a evitar o aparecimento no campo de mais um problema para o controle da podridão branca: a resistência de *S. cepivorum* a fungicidas. Embora ainda não relatada em campo, o fungo tem potencial para desenvolver resistência a fungicidas como os dicarboximidas, conforme mostraram LITLEY & RAHE (1984).

6. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados no presente estudo permitem concluir que:

- a solarização do solo mostra-se eficiente no controle da podridão branca da cebola;
- o principal efeito da solarização foi atrasar o início do desenvolvimento da doença no campo;
- a cobertura do solo com plástico transparente (50 μ m) no processo de solarização foi mais eficiente no controle da podridão branca, quando comparado com a cobertura com plástico preto (30 μ m).
- a técnica de iscas mostra-se bastante eficiente no isolamento seletivo de micorganismos com potencial antagônico a patógenos do solo, como *Sclerotium cepivorum*.

7. LITERATURA CITADA

- ABD-EL MOITY, T.H., PAPAVIDAS, C.G., 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, St. Paul, v.72, p.396-400, 1982.
- ABD-EL RAHIN, M.F., SATOUR, M.M., MICKAIL, K.Y., EL-ERAQI, S.A., GRINSTEIN, A., CHEN, Y., KATAN, J. - Effectiveness of soil solarization in furrow irrigated Egyptian soils - Plant Disease, St. Paul, v.72, p.143-146, 1988.
- ADAMS, P.B. - A rapid method for quantitative isolation of sclerotia of *Sclerotinia minor* and *Sclerotium cepivorum* from soil - Plant Disease Reporter, Beltsville, v.1, n.5, p.349-351, 1979.
- ADAMS, P.B. - Comparison of isolates of *Sporidesmium sclerotivorum* "in vitro" and in soil for potential as active agents in microbial pesticides. Phytopathology, St. Paul, v.77, p.575-578, 1987.
- ADAMS, P.B., AYRES, W.A. - *Sporidesmium sclerotivorum*: its distribution and function in natural biological control of sclerotial fungi - Phytopathology, St. Paul, v.71, p.90-93, 1981.

- AGRIOS, G. - Plant Pathology, 3^a. Edição, Academic Press, San Diego, 803 p., 1989.
- AHMED, F.F.M., THIBE, H.T. - Biological control of white rot of onion (*Sclerotium cepivorum*) by *Coniothyrium minitans* - Plant Pathology, Oxford, v.26, p.75-78, 1977.
- ALCONERO, R. - Crown gall of peachs from Maryland, South Carolina and Tenesse and problems with biological control - Plant Disease, St. Paul, v.64, p. 835-838, 1980.
- ALVES, M.L.B., TANAKA, M.A.S., MENTEN, J.O.M., NUNES, M.E.T. - Inibição do crescimento micelial de *Pyricularia oryzae* do trigo e arroz por isolados de *Bacillus* spp - Fitopatologia Brasileira, Brasília, v.15, p.28-31, 1990.
- ANDREWS, J.H. - Strategies for selecting antagonistic microrganisms from the phyloplane. In: WINDELLS, C.L., LINDON, S.E. - Biological control on the phylloplane, St. Paul, The American Phytopathological Society, p.31-44, 1985.
- ANDREWS, J.H., BERBEE, F.M., NORDHEIN, E.U. - Microbial antagonism to the imperfect stage of the apple scab pathogen, *Venturia inaequalis* - Phytopathology, St. Paul, v.73, p.228-234, 1983.
- ASHWORTH, L.J., GAONA, S.A. - Evaluation of clear polyethylene mulch for controlling *Verticillium* wilt in established pistachio nutgroves - Phytopathology, St Paul, v.72, p.243-246, 1982.
- BAKER, K.F., COOK, R.J. - Biological control of plant pathogens - N.H. Freeman, San Francisco, 433p, 1974.

- BARNET, H.L., HUNTER, B.B. - Illustrated genera of imperfect fungi - 3a. edição, Burgess Publishing Company, Minneapolis, 241 p., 1972.
- BEN-YEPHET, Y., STAPLETON, J.J., WAKEMAN, R.J., DEVAY, J.E. - Comparative effects of soil solarization with single and double layers of polyethylene film on survival of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* - Phytoparasitica, Bet-Dagan, v.15, p.181-187, 1987.
- BEN-YEPHET, Y., MELERO-VERA, J.M., DEVAY, J.E. - Interactions of soil solarization and methan sodium in the destruction of *Verticillium dahliae* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* - Crop Protection, Guildford, v.7, p.327-331, 1988.
- BETTIOL, W. - Seleção de microrganismos antagônicos a *Pyricularia oryzae* Cav. para controle da brusone do arroz (*Oryza sativa* L.) - Piracicaba, ESALQ/USP, 140 p., 1988, Tese doutoramento.
- BOLKAN, H.A., WENHAM, H.T., MILNE, K.S. - Effect of soil temperature on severity of *Rhizoctonia solani* infection on potato shoots - Plant Disease Reporter, Beltsville, v.58, p.646-649, 1974.
- BROADBENT, P., BAKER, K.F., WATWORTH, Y. - Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils - Australian Journal of Biological Science, Victoria, v.24, p.925-944, 1971.

- CENTURION, M.A.P.C., KIMATI, H. - Seleção de microrganismos antagônicos à ferrugem do feijoeiro (*Uromyces phaseoli*). In: Reunião Brasileira Sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas, 4, 1991, Campinas, Anais, EMBRAPA/CNPDA, p.1, 1991a.
- CENTURION, M.A.P.C., KIMATI, H.- Mecanismos de controle biológico de microrganismos antagônicos à ferrugem de feijoeiro (*Uromyces phaseoli*). In: Reunião Brasileira Sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas, 4, 1991, Campinas, Anais, EMBRAPA/CNPDA, p.1, 1991b.
- CHEN, Y., KATAN, J. - Effect of solar heating of soils by transparent polyethylene mulching on their chemical properties - Soil Science, v.130, p.271-277, 1980.
- COLEY-SMITH, J.R. - Studies of the biology of *Sclerotium cepivorum* Berk. III: Host range, persistence and viability of sclerotia - Annals of Applied Biology, Wellesbourne, v.47, p.511-518, 1959.
- COLEY-SMITH, J.R. - Studies on the biology of *Sclerotium cepivorum* Berk. - IV: Germination of sclerotia - Annals of Applied Biology, Wellesbourne, v.45, p.8-18, 1960.
- COLLEY-SMITH, J.R. - White rot disease of *Allium*: problems of soilborne diseases in microcosm. Plant Pathology, Oxford, v.39, p.214-222, 1990.
- COLEY-SMITH, J.R., ENTWISTLE, A.R. - Suceptibility of cultivars of garlic to *Sclerotium cepivorum* - Plant Pathology, Oxford, v.37, p.261-264, 1988.

- COLEY-SMITH, J.R., ESLER, G. - Infection of cultivars of onion, leek, garlic, and *Allium fistulosum* by *Sclerotium cepivorum* - Plant Pathology, Oxford, v.36, p.373-376, 1983.
- COLEY-SMITH, J.R., MITCHELL, C.M., SANSFORD, C.E. - Long-term survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and *Stromatinea gladioli* - Plant Pathology, Oxford, v.39, p.58-69, 1990.
- COLEY-SMITH, J.R., PARFITT, D., TAYLOR, I.M., REESE, R.A. - Studies of dormancy in sclerotia of *Sclerotium cepivorum* - Plant Pathology, Oxford, v.36, p.594-599, 1987.
- COOK, R.J., BAKER, K.F. - The nature and practice of biological control of plant pathogens - APS Press, St. Paul, 584 p., 1983.
- CROWE, F.J., HALL, D.H. - Soil temperature and moisture effects on sclerotium germination and infection of onion seedlings by *Sclerotium cepivorum* - Phytopathology, St Paul, v.70, n.1, p.74-78, 1980.
- CROWE, F.J., HALL, D.H., GREATHEAD, A.S., BAGHOTT, K.W. - Innoculum density of *Sclerotium cepivorum* and the incidence of onion white rot of onion and garlic - Phytopathology, St. Paul, v.70, p.64-69, 1980.
- CRUZ, B.P.B., TERANISHI, J., BERNARDI, J.B., ILVEIRA, S.G.P. - Podridão branca do alho: comportamento de variedades - O Biológico, São Paulo, v.39, p.151-157, 1973.

- CRUZ FILHO, J., SILVA, P.M., JACCOUD FILHO, D.S., PÁDUA, J.G., GOMIDE, J.S. - Efeito de fungicidas no controle da podridão branca (*Sclerotium cepivorum*) em alho (*Allium sativum* L.) - Fitopatologia Brasileira, Brasília, v.9, p.371, 1984.
- DAVET, P. - Effects de quelques pesticides sur la colonization d'un substrat par le *Trichoderma harzianum* Rifai en presence des autres champignons du soil - Soil Biology Biochemistry, Elmsford, v.13, p. 513-517, 1981.
- DHINGRA, O.D., SINCLAIR, J.B. - Basic Plant Pathological Methods - APS Press, St. Paul, 355 p., 1985.
- ELAD, Y.; KATAN, J.; CHET, J. - Physical, biological and chemical contrl integrated for soilborne diseases in potatoes - Phytopathology, St. Paul, v.70, p.418-422, 1980.
- ENTWISTLE, A.R., MUNASHINGHE, H.L. - The effect of seed, furrow and stem base spray treatment with iprodione on white rot disease (*Sclerotium cepivorum*) in spring sown salad onions - Annals of Applied Biology, Wellesbourne, v.94, p.215-224, 1980.
- ESLER, G., COLEY-SMITH, J.R. - Flavour and odour characteristics of species of *Allium* in relation to their capacity to stimulate germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* - Plant Pathology, Oxford, v.32, p.13-22, 1983.

- ESLER, G., COLEY-SMITH, J.R. - Resistance of *Sclerotium cepivorum* in *Allium* and other genera - Plant Pathology, Oxford, v.33, p.199-204, 1984.
- EVANS, E. - Survival recolonization by fungi in soil treated with formalin and carbon disulfide - Trans. Brit. Mycological Society, London, v.38, p.335-346, 1957.
- FERREIRA, M.D., CASTELLANE, P.D. - Cultura da cebola: recomendações gerais - COOXUPÉ, São José do Rio Pardo, 10 p., s.d.
- FIGUEIREDO, M.B., PIMENTEL, C.P.V. - Métodos utilizados para conservação de fungos na micoteca da seção de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico - Summa Phythopathologica, São Paulo, v.1, n.4, p.299-302, 1975.
- FREEMAN, S., SZTJNBERG, A., SHABI, E., KATAN, J. - Long term effect of soil solarization for the control of *Roselinea necatrix* in apple - Crop Protection, Guildford, v.9, p.312-319, 1990.
- GEORGY, N.I., COLEY-SMITH, J.R. - Variation on morphology of *Sclerotium cepivorum* sclerotia - Transactions British Mycological Society, London, v.79, p.534-536, 1982.
- GHINI, R., IMAUTI, M.T., KIMATI, H. - Obtenção de isolados de *Trichoderma* antagônicos a *Botrytis cinerea* pelo método de iscas - Reunião Brasileira Sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas, 2, Piracicaba, 1987 Anais, Piracicaba, Fundação Cargill, 58 p., 1987.

- GHINI, R., KIMATI, H. - Método de iscas para a obtenção de isolados de *Trichoderma* antagônicos a *Botrytis cinerea* Boletim de Pesquisa - CNPDA / EMBRAPA, n.3, 13p., 1989.
- GREENBERGER, A., YOGEV, A., KATAN, J. - Induced suppressiveness in solarized soils - Phytopathology, v.71, p.1663-1667, 1987.
- GRINSTEIN, A., KATAN, J., ABDUL-RAZIK, A., ZEIDAN, O., ELAD, Y. - Control of *Sclerotium rolfsii* and weeds in peanuts by solar heating of soil - Plant Disease Reporter, Beltsville, v.63, p.1056-1059, 1979.
- HOMECHIN, M. - Potencial e emprego de isolados de *Trichoderma harzianum* Rifai, para o controle de patógenos da soja - Piracicaba, ESALQ/USP, 186p., 1987, Tese doutoramento.
- JACCOUD FILHO, D.S., ZAMBOLIN, L., CRUZ FILHO, J. - Doenças do alho e cebola - Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.31, p.3-14, 1985
- KATAN, J. - Solar pasteurization of soils for disease control: status and prospects - Plant Disease, St. Paul, v.64, n.5, p.450-454, 1980.
- KATAN, J. - Solar heating (solarization) of soil for the control of soilborne pests - Annual Review of Plant Pathology, Palo Alto, v.19, p.211-236, 1981.
- KATAN, J. - Solar desinfestation of soil -In:PARKER,C.A., ROVIRA, A.D., MOORE, K.J., WONG,P.T.W. - Ecology and management of soilborn plant pathogens - APS Press,St. Paul, p.274-278, 1983.

- KATAN, J. - Soil solarization: present status and future prospects - In: Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas, 4, 1991, Campinas, Anais, Campinas, EMBRAPA/CNPDA, p.203-214, 1991.
- KATAN, J., GREENBERGER, H., ALON, H., GRINSTEIN, A. - Solar heating by polyethylene mulching for the control of diseases caused by soilborne pathogens - Phytopathology, St Paul, v.66, p.663-688, 1976.
- KATAN, J., ROTEM, I., FINKEL, Y., DANIEL, J. - Solar heating of soil for the control of pink root and other soilborne diseases in onions - Phytoparasitica, Bet-Dagan, v.8, n.1, p.39-50, 1980.
- KATAN, J., FISHER, G., GRINSTEIN, A. - Short and long term effects of soil solarization and crop sequence on *Fusarium* wilt and yield of cotton in Israel - Phytopathology, St. Paul, v.73, p.1215-1219, 1983.
- KIMATI, H. - Doenças do alho e da cebola - In: GALLI, F. (coord.) - Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas, v.2, 2ª. edição, São Paulo, Editora Agronômica Ceres, p.49-64, 1980
- LASA, C.I. - Control químico de la podredumbre blanca del ajo causada por *Sclerotium cepivorum* - Investigaciones Agronômicas, Montevideo, n.5, p.68-72, 1984.
- LITTLE, E.R., RAHE, J.E. - Specific tolerance of *Sclerotium cepivorum* to dicarboxamide fungicides - Plant Disease, St Paul, v.68, p. 371-374, 1984.

- MERRIMAN, P.R., ISAACS, S., MCGREGOR, R.R., TOWER, J.B. - Control of white rot in dry bulb onions with artificial onion oil - Annals of Applied Biology, Wellesbourne, v.96, p.163-168, 1981.
- MIHAIL, J.D., ALCORN, S.M. - Effects of soil solarization on *Macrophomina phaseolina* and *Sclerotium rolfsii* - Plant Disease, S.Paul, v.68, p.156-159, 1984.
- MORGAN, F.L. - Infection inhibition and germtube lysis on three cereal rust by *Bacillus pumilis* - Phytopathology, St. Paul, v.53, p.1346-1348, 1963.
- MUNNECKE, D.E., WILBUR, W., DARRLEY, D.F. - Effect of heating and drying on *Armilaria mellea* or *Trichoderma viride* and the relation to survival of *A. mellea* in soil - Phytopathology, St. Paul, v.66, p.1363-1368, 1976.
- NUNES, M.E.T., FERREIRA, M.D. - Podridão Branca: um problema que se alastra - Folha Rural, Cooxupé, São José do Rio Pardo, n.131, p.2, 1989.
- NUNES, M.E.T., BETTIOL, W., KIMATI, H. - Influência de isolados de *Bacillus* no crescimento micelial de *Helminthosporium oryzae*, causador da mancha parda foliar do arroz (*Oryza sativa* L.) - In: Reunião sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas, 1, 1986, Piracicaba, Anais, Campinas, Fundação Cargill, p.59, 1986a.
- NUNES, M.E.T., BETTIOL, W., KIMATI, H. - Seleção de microrganismos antagônicos a *Helminthosporium oryzae* para controle da mancha parda do arroz - Fitopatologia Brasileira, Brasília, v.11, p.336, 1986b.

- OLSEN, C.M., BAKER, K.F. - Selective heat treatment of soil and its effect on the inhibition of *Rhizoctonia solani* by *Bacillus subtilis* - Phytopathology, St. Paul, v.58, p.79-87, 1968.
- PAPAVIZAS, G.C. - Isolation and enumeration of propagules of *Sclerotium cepivorum* from soil - Phytopathology, St. Paul, v.62, p.545-549, 1972.
- PAPAVIZAS, C. G. - Survival of *Trichoderma harzianum* in soil and in pea and bean rhizosphere - Phytopathology, St. Paul, v.71, p. 121-125, 1981.
- PAPAVIZAS, C.G., LEWIS, J.A., ABD - EL MOITY, T.H. - Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl tolerance and enhanced biocontrol capabilities - Phytopathology, St. Paul, v.72, p.126-132, 1982.
- PORTER, I.J., MERRIMAN, P.R. - Evaluation of soil solarization for control of clubrot of crucifers and white rot of onion in Southeastern Australia - In: PARKER, C.A, ROVIRA, A.D., MOORE, K.J., WONG. P.T.- Ecology and Management of Soilborne Plant Pathogens, APS Press, St. Paul, p.282-284, 1983a.
- PORTER, G.C., MERRIMAN, P.R. - Effects of solarization of soil on nemathode and fungal pathogens at two sites in Victoria - Soil Biology Biochemistry, London, v.15, p.39-44, 1983b.

- PULLMAN, G.S., DEVAY, J.E., GARBER, R.H. - Soil solarization and thermal death: a logarithmic relationship between time and temperature for four soilborne plant pathogens - Phytopathology, St. Paul, v.71, p.959-964, 1981.
- RABINOWITCH, H.D.; KATAN, J.; ROTEM, I. - The response of onion to solar heating, agricultural practices and pink rot disease - Scientia Horticulturae, v.15, p.331-340, 1981.
- RANDHAWA, P.J., SCHAAD, N.W. - A seedling bioassay chamber for determining bacterial colonization and antagonism in plants roots - Phytopathology, St. Paul, v.75, p. 254-259, 1985.
- RESENDE, M.L.V. - Modelo de previsão e controle da podridão branca do alho (*Allium 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. - Eficiência de métodos utilizados para a quantificação da população de *Sclerotium cepivorum* Berk. no solo - Fitopatologia Brasileira, Brasília, v.11, n.3, p. 493-500, 1986.
- RESENDE, M.L.V., ZAMBOLIN, L. - Flutuação populacional de *Sclerotium cepivorum* no solo em função do tratamento com diferentes fungicidas no plantio - Fitopatologia Brasileira, Brasília, v.12, p. 65-70, 1987.

- RESENDE, M.L.V., ZAMBOLIM, L., CRUZ FILHO, J. - Eficência 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, Brasília, v.12, p.71-78, 1987.
- SCHAAD, N.W. - Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria - APS Press, St. Paul, 157 p., 1988.
- SCHOROTH, M.N., HANCOCK, J.G. - Selected topics in biological control of plant pathogens - Annual Review Microbiology, Palo Alto, v.35, p.453-476, 1981.
- SCOTT, M.R. - Studies on the biology of *Sclerotium cepivorum* Berk.- I: Growth of the micelium in soil - Annals of Applied Biology, Wellesbourne, v.44, p.576-583, 1956.
- SOMERVILLE, P.A. - Factors affecting sclerotial germination of *Sclerotium cepivorum*, secondary sclerotia formation and germination stimulants to reduce inoculum density - Plant Disease, S.Paul, v.71, p.229-233, 1987.
- STAPLETON, J.J., DEVAY, J.E. - Effect of soil solarization on populations of selected soilborne microorganisms and growth of deciduous fruit tree seedlings - Phytopathology, St. Paul, v.74, p.255-259, 1984.
- TRUTMANN, P., KEANG, P.J., MERRIMAN, P.R. - Reduction of sclerotial inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum* with *Coiothyrium minitans* - Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v.12, p.461-465, 1980.

- USMANI, S.M.H., GHAFAR, A. - Polyethylene mulching of soil to reduce viability of sclerotia of *Sclerotium oryzae* - Soil Biology Biochemistry, London, v.14, p.203-206, 1982.
- UTKHEDE, P.S., RAHE, J.E. - Screening commercial onion cultivars for resistance to white rot - Phytopathology, St. Paul, v.68, p.1080-1083, 1978a.
- UTKHEDE, R.S., RAHE, J.E. - Screening world onion germplasm collection for resistance to white rot - Canadian Journal of Plant Science, v.58, p.819-822, 1978b.
- UTKHEDE, P.S., RAHE, J.E. - Biological control of onion white rot - Soil Biology Biochemistry, London, v.12, p.101-104, 1980.
- UTKEDE, P.S., RAHE, J.E. - Interactions of antagonist and pathogen in biological control of onion white rot - Phytopathology, S.Paul, v.73, p.890-893, 1983.
- WADI, J.G. - Control of *Verticillium dhaliae* by coating potato seed peaces with antagonistic bacteria - In: PARKER, C.A., ROVIRA, A.D., MOORE, K.J., WONG, P.T.W. - Ecology and management of soilborne plant pathogens - APS Press, St. Paul, p.134-136, 1985.
- WEHER, D.M. - Biological control of soilborne plant pathogens in rhizosphere with bacteria - Annual Review of Plant Pathology v. 26, p. 379-407, 1988.
- WHITE, G.J., BUCZACKI, S.T., - Observations on supression of clubrot by artificial or natural heating of soil - Transactions of British Mycological Society, London, v.73, p.271-275, 1979.

ZAZZERINI, A., TOSI, L. - Prove di antagonismo di alcuni isolati battericinei confronti della *Sclerotinia sclerotiorum* (lib.) de Bay. - Informatore Fitopatologico, Bologna, v.35, p.27-30, 1985.