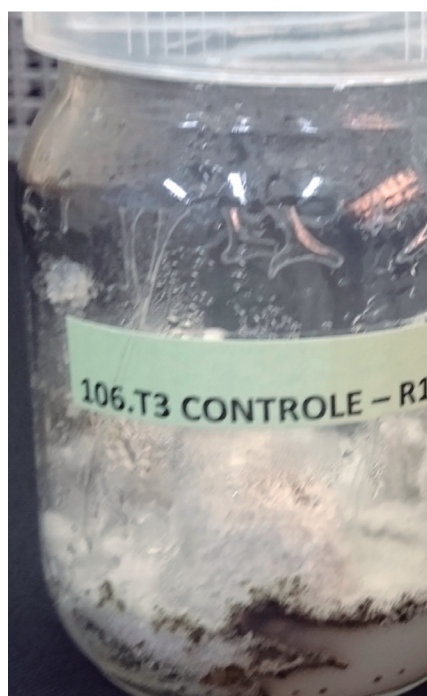


Seleção in vitro de linhagens de *Trichoderma* para controle da podridão-branca do alho e da cebola.



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento***

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
334**

**Seleção in vitro de linhagens de
Trichoderma para controle da podridão-
branca do alho e da cebola.**

*Maria Cléria Valadares-Inglis
Irene Martins
Joseane Padilha da Silva
Sueli Corrêa Marques de Mello*

***Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2018***

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica
PqEB, Av. W5 Norte (final)
70970-717, Brasília, DF
Fone: +55 (61) 3448-4700
Fax: +55 (61) 3340-3624
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Marília Lobo Burle

Secretário-Executivo
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Membros
Antonietta Nassif Salomão; Diva Maria Alencar Dusi; Francisco Guilherme V. Schmidt; João Batista Teixeira; João Batista Tavares da Silva Maria Cléria Valadares-Inglis; Tânia da Silveira Agostini Costa

Supervisão editorial
Marília Lobo Burle

Revisão de texto
João Batista Teixeira

Normalização bibliográfica
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Tratamento das ilustrações
Adilson Werneck

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Adilson Werneck

Foto da capa
Maria Cléria Valadares-Inglis

1ª edição
1ª impressão (ano): tiragem

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Seleção in vitro de linhagens de *Trichoderma* para controle da podridão-branca do alho e da cebola / Maria Cléria Valadares-Inglis... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2018.

23 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 334).

1. *Sclerotium cepivorum*. 2. *Trichoderma*. 3. Seleção de linhagens. I. Valadares-Inglis, Maria Cléria. II. Martins, Irene. III. Silva, Joseane Padilha. IV. Mello, Sueli Correa de. V. Série.

633.3496 – CDD 21

Sumário

Resumo5

Abstract6

Introdução.....7

Material e Métodos 11

Resultados e Discussão13

Conclusões.....18

Agradecimentos18

Referências19

Seleção in vitro de linhagens de *Trichoderma* para controle da podridão-branca do alho e da cebola.

Maria Cléria Valadares-Inglis¹

Irene Martins²

Joseane Padilha da Silva³

Sueli Corrêa Marques de Mello⁴

Resumo – A podridão-branca é uma doença causada pelo fungo *Sclerotium cepivorum* que ataca as aliáceas, em todas as regiões de cultivo. O fungo *Trichoderma* vem sendo utilizado no controle de várias doenças de plantas de importância agrícola e apresenta-se como uma das melhores alternativas para o controle da podridão-branca, em cultivos de alho e cebola. Doze linhagens pertencentes a seis espécies de *Trichoderma* previamente identificadas, isoladas de solos de cultivo de alho e cebola foram utilizadas neste estudo. As linhagens foram analisadas quanto ao potencial de proteção de plantas, pela promoção de crescimento ou supressão do patógeno, sendo também analisadas quanto à sensibilidade ao extrato de alho. Experimentos in vitro mostraram que a linhagem CEN1416 de *T. harzianum* destacou-se, apresentando efeito positivo nas plantas cultivadas in vitro e inoculadas com o patógeno, as quais diferiram significativamente no crescimento de raiz e parte aérea. Esta linhagem também apresentou bom crescimento em meio contendo extrato de alho, enquanto algumas outras foram totalmente inibidas, como no caso da linhagem CEN1418 de *T. asperellum*. Estes resultados são importantes, pois trazem novos parâmetros para seleção de linhagens de *Trichoderma* ativos contra *S. cepivorum*. Estudos complementares estão sendo desenvolvidos, envolvendo o isolado CEN1416, para confirmar seu potencial de biocontrole da podridão-branca do alho e da cebola.

¹ Bióloga, PhD, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

² Bióloga, mestre, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³ Estatística, mestre, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴ Agrônoma, doutora, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Termos para indexação: *Trichoderma*, podridão-branca, alho, cebola, *Sclerotium cepivorum*

Abstract – White rot is a disease caused by the fungus *Sclerotium cepivorum* that attacks alliaceus species in all cultivated regions. The fungus *Trichoderma* has been used for the control of several plant diseases in agriculture and is one of the best alternatives to control white rot in garlic and onion crops. Twelve strains belonging to six previously identified *Trichoderma* species, isolated from soils cultivated with garlic and onion, were used for in vitro selection. The strains were analysed in vitro for their potential to protect plants inoculated with the pathogen and were tested for growth inhibition by garlic extract. *Trichoderma harzianum* strain CEN1416 is demonstrated to have a positive effect on root and shoot growth in plants infected with the pathogen. This strain also showed good growth in medium containing garlic extract, while some others were totally inhibited; for example, strain CEN1418 of *Trichoderma asperellum*. These results are important because they identify new parameters for the selection of *Trichoderma strains*, active against *S. cepivorum*. Further studies are ongoing involving the CEN1416 strain to confirm its potential as a biocontrol agent of white garlic and onion rot.

Index terms: *Trichoderma*, *Allium* root rot, *Sclerotium cepivorum*

Introdução

O fungo *Sclerotium cepivorum* Berk é o agente causal da podridão-branca, uma das mais devastadoras doenças dos cultivos de alho e cebola em todo o mundo, causando grandes perdas econômicas. Uma vez detectada no campo, a doença é difícil de ser controlada e em muitos casos a área de cultivo torna-se indisponível para o plantio de espécies de *Allium Linneaus*. Este patógeno pode atacar plantas em diferentes estágios de desenvolvimento (Entwistle, 1990) e seus esclerócios, estruturas de resistência, podem sobreviver no solo por aproximadamente 20 anos (Coley-Smith, 1990). O manejo da doença é extremamente difícil e necessita de estratégias múltiplas, não existindo nenhuma estratégia altamente eficiente até o momento. Nas últimas décadas, inúmeros trabalhos vêm sendo conduzidos na tentativa de se obter métodos eficientes para supressão de *S. cepivorum*, seja por meio de fungicidas químicos (Fullerton & Steward, 1991), incorporação de misturas de compostos vegetais no solo (Coventry et al., 2005; Sammour et al., 2012) ou controle biológico com o uso de fungos antagonistas, principalmente *Trichoderma Pers.* (Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales, teleomorfo Hypocrea) (Clarkson et al., 2002). Também tem sido utilizada a associação do controle biológico com fungicidas químicos (Dilbo et al., 2015). Bontempo (2016) mostrou que linhagens de *Trichoderma* são capazes de reduzir a germinação de esclerócios de *S. cepivorum* em ensaios in vitro. Clarkson et al. (2004) mostraram que dois isolados de *Trichoderma viride Pers.* e um isolado de *Trichoderma pseudokoningii* Rifai degradaram 80% dos esclerócios presentes no solo.

Embora potencialmente eficiente, o controle biológico necessita ser melhor avaliado, uma vez que os resultados obtidos são geralmente variáveis, devido a vários fatores, como uso de linhagens pouco adaptadas ou pouco tolerantes a variações climáticas, seleções inapropriadas de linhagens e peculiaridades dos ciclos de vida dos patógenos (Kay & Steward, 1994). Vale destacar que os conhecimentos sobre fatores bióticos e abióticos que interferem no desenvolvimento e atuação do fungo antagonista são ainda escassos. Os testes de antagonismo geralmente são conduzidos in vitro, em placas de Petri, por confronto direto, tendo meios artificiais como substrato. Entretanto, nem sempre os resultados obtidos são reproduzíveis em experimentos in vivo. Hussain et al., (2017) testaram diferentes espécies de

Trichoderma para a supressão de *S. cepivorum* em cebola, mostrando que, em ensaios de inibição in vitro, *Trichoderma hamatum* (Bonorden) Bainier inibiu 100% do crescimento do patógeno. Entretanto, nos experimentos de casa de vegetação, a maior eficiência na redução de incidência da doença foi obtida com a combinação de linhagens de *Trichoderma harzianum* Rifai e *T. hamatum*. A combinação de linhagens apresenta potencial para melhorar a atividade antagônica contra o patógeno-alvo, pelo efeito sinérgico de modos de ação distintos ou dos diferentes atributos relativos à diversidade genética das linhagens utilizadas.

A seleção do agente de biocontrole em experimentos in vitro, utilizando plantas em crescimento, torna-se essencial para identificar linhagens com capacidade de proteger e/ou promover o crescimento de plantas, em presença do patógeno. Cabe salientar que um aspecto fundamental na exploração econômica da biodiversidade microbiana para desenvolvimento de biopesticidas reside na descoberta de linhagens com maior atividade ou mais adaptadas às condições ambientais onde esses produtos serão utilizados, daí a relevância deste trabalho.

Extratos de alho são amplamente conhecidos pela atividade antifúngica e são promissores no tratamento de doenças associadas a fungos causadores de patologias em humanos e animais, principalmente do gênero *Candida* e *Malassezia* (Shams-Ghahfarokhi et al., 2006); *Trichophyton mentagrophytes* (Priestley) (Masoomi et al., 2003) e *Trichothyrton rubrum* (Castell.) (Aala et al., 2014) e também vem sendo estudados quanto à atividade contra fungos de importância agrícola. Extratos de alho analisados quanto à atividade inibitória do crescimento de *Alternaria alternata* (Keissl.), *Aspergillus spp.*, *Colletotrichum acutatum* (J.H. Simmonds), *Didymella bryonia* (Fuckel) Rehm, *Fusarium culmorum* (Wm.G.Sm.) Sacc., *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc., *Fusarium graminearum* (Schwein.) Petch, *Gliocladium roseum* (Link) Schroers, *Pythium splendens* (Hans Braun), *Rhizoctonia solani* (J.G. Kühn), *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Stemphylium vesicarium* (Wallr.) E.G. Simmons, *Trichoderma longibrachiatum* Rifai e *Botrytis cinerea* Pers., Tedeschi et al. (2007), mostraram que estes extratos, além de apresentarem atividade fungicida contra *B. cinerea*, *S. rolfsii*, *F. oxysporum*, *F. culmorum*, *R. solani* e *T. longibrachiatum*, possuem significativa atividade inseticida contra larvas de *Aedes albopictus* Skuse (Tedeschi et al., 2011). Allicin (allyl 2-propenethiosulfonato ou diallyl thiosulfonato) é o principal composto bioativo

presente em extratos aquosos de alho. Entretanto, outros compostos estão presentes, sendo que todo o complexo apresenta vários efeitos terapêuticos e propriedades antifúngicas e antibacterianas (Bayan et al., 2014). Trabalhos desenvolvidos por Wallock-Richards et al. (2014) mostraram que extrato aquoso de alho exibe atividade contra a bactéria *Burkholderia cepacia* (Yabuuchi et al), considerada um dos mais severos patógenos bacterianos das allíáceas.

Devido ao grande potencial de isolados de *Trichoderma* no controle de *S. cepivorum* e também à plasticidade de isolados de regiões geográficas específicas, o presente trabalho teve por objetivos: 1) selecionar, in vitro, linhagens desse fungo coletadas nas regiões de cultivo de alho e cebola, portanto, adaptadas às condições edafoclimáticas dessas regiões e que possam ser utilizadas, futuramente, no controle da podridão-branca; 2) testar o efeito inibitório de extrato de alho no crescimento dessas espécies de *Trichoderma*.

Material e Métodos

Cultivar de alho e condições de cultivo

Bulbilhos-semente de *A. sativum* cultivar Espírito Santo Gigante, provenientes de cultivo orgânico, foram desinfestados por lavagem em álcool 70% por 1 min; hipoclorito de sódio 2% por 1 min e água esterilizada por 1 min. Os bulbilhos foram, então, deixados a secar em capela de fluxo laminar sobre papel filtro estéril. Após esse procedimento, os bulbilhos foram transferidos para frascos de vidro com tampas plásticas, contendo 40 ml de meio MS (Murashige & Skoog pH 5.5), sendo utilizados, 04 bulbilhos por frasco. O experimento foi incubado a 25° C com fotoperíodo de 12 horas de luz.

Linhagens de *Trichoderma* utilizadas

Doze linhagens de *Trichoderma* representantes de seis espécies (Tabela 1) foram inoculadas em meio SDY (1% peptona, 4% dextrose, 1% extrato de levedura e 2% de ágar) e incubadas por 05 dias a 28° C, para produção de esporos. Estes foram coletados por lavagem da placa com água destilada

esterilizada e contados com o auxílio de Câmara de Neubauer. Bulbilhos de alho foram inoculados individualmente com 10µl das suspensões contendo 10^8 ml-1 esporos.

Tabela 1. Linhagens de *Trichoderma* utilizadas nos experimentos

Código	Código Coleção Embrapa	Espécie de <i>Trichoderma</i>	Local de origem
L1	CEN1386	<i>T. koningiopsis</i>	Curitibanos/SC
L3	CEN1387	<i>T. tomentosum</i>	Curitibanos/SC
L5	CEN1389	<i>T. tomentosum</i>	Curitibanos/SC
L12	CEN1394	<i>T. hamatum</i>	Rio Paranaíba/MG
L15	CEN1397	<i>T. asperellum</i>	Rio Paranaíba/MG
L18	CEN1399	<i>T. longibrachitaum</i>	São Marcos/RS
L21	CEN1401	<i>T. longibrachitaum</i>	São Marcos/RS
L23	CEN1403	<i>T. harzianum</i>	São Marcos/RS
L27	CEN1406	<i>T. koningiopsis</i>	São Marcos/RS
L39	CEN1416	<i>T. harzianum</i>	São José do Rio Pardo/SP
L41	CEN1418	<i>T. asperellum</i>	São José do Rio Pardo/SP
L0	CEN693*	<i>T. hamatum</i>	Brasília/DF

*Esta linhagem não foi isolada de solo de cultivo de alho e cebola

Sclerotium cepivorum

Discos de meio (5 mmΦ), contendo estruturas de *S. cepivorum* foram transferidos para o mesmo meio e as novas culturas incubadas por 05 dias a 18°C. Destas culturas, discos (1 mmΦ) foram coletados e utilizados para infectar bulbilhos de *Allium sativum*, tendo sido inoculados, em média, 13,6 esclerócios por bulbilho. A quantidade média de esclerócios por disco utilizado para inoculação foi obtida a partir da contagem de 09 discos.

Produção de metabólitos não voláteis

Linhagens de *Trichoderma* foram inoculadas em frascos de Erlenmeyer de 250 ml, contendo 100 ml de meio SDY (sabouraud dextrose ágar) e mantidos com agitação de 250 rpm por 7 dias. As amostras foram esterilizadas utili-

zando filtro Millipore e 25 (μm) e 2,5 mL de cada filtrado foram adicionados à superfície do meio MS, nos tratamentos correspondentes. O controle foi feito com a adição de 2,5 mL de meio SDY.

Desenho experimental

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial de dois fatores, representados pelas 12 linhagens de *Trichoderma* e metabólitos voláteis (filtrados de culturas) de cada linhagem, com três repetições. No tratamento T1, foram avaliados os efeitos dos metabólitos secretados pelas linhagens de *Trichoderma*, em meio líquido, no desenvolvimento de bulbilhos de alho; no tratamento T2, os bulbilhos de alho foram inoculados com esporos das linhagens de *Trichoderma*; no tratamento T3, os bulbilhos foram inoculados com o patógeno e com esporos de *Trichoderma* e, no tratamento T4, os bulbilhos foram inoculados com o patógeno (*S. cepivorum*) e tratados com os filtrados das linhagens de *Trichoderma*. Os controles dos tratamentos 01 e 04 consistiram de meio de cultivo utilizado para produção dos metabólitos (meio BDA sintético líquido); para o tratamento 03, os controles consistiram em inoculação com água esterilizada e com o patógeno; no tratamento 04, os bulbilhos foram inoculados com o patógeno. Foi quantificado o número de bulbilhos brotados e obtidos os valores médios de peso úmido de raízes e de parte aérea das plântulas, após três semanas de desenvolvimento. A avaliação da ocorrência do patógeno foi feita pela observação visual de sinais e sintomas, sem medidas de danos causados pela doença.

Crescimento de *Trichoderma* em meio contendo extrato de alho

Alho orgânico (50g) foi moído e adicionado a 100 ml de etanol absoluto (10%). A mistura foi deixada por 12 horas a temperatura ambiente. Após filtragem em papel filtro Whatman e filtro Millipore (40 μm), 1 ml do extrato foi adicionado à superfície de placas de Petri contendo 20 ml de meio BDA sintético (pH 5.3). Discos (5 mm de diâmetro) de meio contendo linhagens de *Trichoderma* e de *S. cepivorum* foram inoculados no centro das placas e estas incubadas a 25°C e a 20°C, para *Trichoderma* e *S. cepivorum*, respectivamente. Além das linhagens listadas acima, foi utilizada a linhagem CEN693 de *T. hamatum*. O crescimento foi avaliado por medição diária do diâmetro da colônia, utilizando paquímetro digital. O experimento foi conduzido em triplicata.

Resultados e Discussão

Efeito de *Trichoderma* e seus metabólitos não voláteis no desenvolvimento de plântulas de alho e no controle de *S. cepivorum*

Após três semanas de incubação, foram tomadas medidas do crescimento de parte aérea e de raiz das plântulas. Para verificar o efeito das linhagens e dos metabólitos sobre o peso da raiz e da parte aérea, os dados foram primeiramente submetidos a uma transformação boxcox para a aplicação da análise de variância seguida do teste de Scott-Knott (1974). O nível de significância adotado foi de 5%. As análises foram desenvolvidas com o auxílio do programa de linguagem estatística R Core Team (2017) através da biblioteca Scott-Knott.

Pela análise de variância (ANOVA), constatou-se efeito significativo de tratamento com metabólitos, bem como de linhagem sobre o peso da raiz, mas não da interação (Tabela 2) entre esses dois fatores. A clusterização via Scott-Knott mostrou a formação de dois grupos distintos. O primeiro grupo mostrou que as linhagens CEN1399, CEN1403 e CEN1387 não diferem do controle, quanto à indução de crescimento da raiz, quando utilizadas suspensões de conídios. Entretanto, neste mesmo grupo foi possível observar o efeito de metabólitos secretados pelas linhagens CEN1403 e CEN1406 sobre o crescimento de raiz, destacando-se das demais linhagens. No tratamento T3 (inoculado com patógeno e *Trichoderma*), destacaram-se as linhagens CEN1403, CEN1416 e CEN1394, com diferenças observadas no crescimento de raiz (Figura 1).

Tabela 2 – Análise de variância do efeito de linhagens de *Trichoderma* e seus metabólitos sobre o peso de raízes de plântulas de alho.

Fonte	gl	SQ	QM	F	P-valor
Tratamento	3	2.209	0.7363	6.609	0.000416
Linhagem	14	3.513	0.2509	2.252	0.010757
Tratamento/linhagem	30	4.129	0.1376	1.235	0.218901
Resíduo	96	10.694	0.1114		

Tabela 3 – Análise de variância do efeito das linhagens de *Trichoderma* e seus metabólitos sobre o desenvolvimento de parte aérea em plântulas de alho.

Fonte	gl	SQ	QM	F	P-valor
Tratamento	3	4.618	1.5392	7.52	0.000142
Linhagem	14	9.673	0.6909	3.376	0.000197
Tratamento/linhagem	30	9.484	0.3161	1.545	0.058478
Resíduo	96	19.648	0.2047		

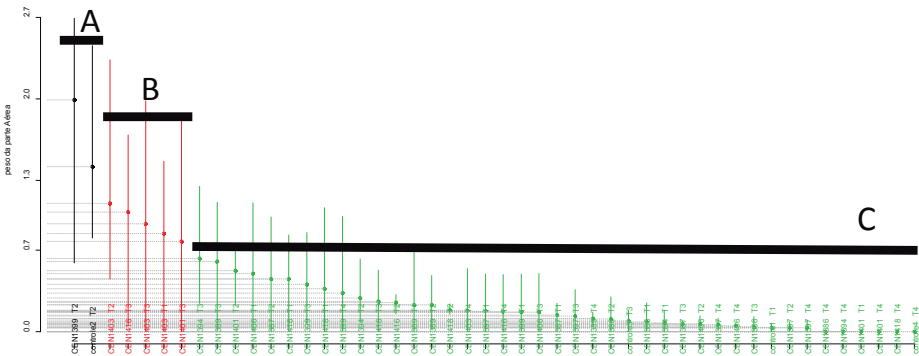


Figura 2 – Agrupamentos A, B e C dos isolados de *Trichoderma* pelo teste Scott-Knott obtido com base no peso de parte aérea de plântulas de alho. Tratamentos com cores diferentes indicam diferenças ($P<0,05$).

Efeito de *Trichoderma* e seus metabólitos na proteção de bulbilhos- semente de alho

Apesar de não terem sido avaliados os danos de *S. cepivorum* nas plântulas, observou-se o potencial das linhagens de *Trichoderma* na proteção dos bulbilhos-semente de alho, principalmente nos tratamentos onde foram inoculados patógenos e *Trichoderma*. Os mecanismos de ação de

Trichoderma spp. sobre patógenos envolvem antibiose, parasitismo, competição e indução de crescimento (Kaewchai et al., 2009). Além dos efeitos no crescimento, observou-se também que as linhagens de *Trichoderma* protegem os bulbilhos de alho contra a infecção por *S. cepivorum*. Bulbilhos inoculados com esporos das diferentes linhagens de *Trichoderma* não mostraram a ocorrência de *S. cepivorum*, enquanto que no controle observou-se um crescimento micelial denso do patógeno. A Figura 3 ilustra a ausência de patógeno em tratamento realizado com esporos de *Trichoderma* e com o patógeno, podendo se observar que o controle está totalmente colonizado pelo patógeno e os bulbilhos tratados com *Trichoderma* não foram colonizados pelo patógeno, apresentando desenvolvimento aéreo e de raízes. Nota-se uma coloração verde, evidenciando a colonização pelo agente de biocontrole.



Foto: Maria Cleria Valadares-Ingliš

Figura 3. Inibição do desenvolvimento de *Sclerotium cepivorum* pela linhagem CEN1399 de *T. longibrachiatum*, em bulbilhos de alho inoculados com ambos os fungos.

Com relação ao efeito dos metabólitos secretados por diferentes linhagens de *Trichoderma*, também observaram-se diferenças na proteção de bulbilhos-semente de alho, contra o patógeno em estudo. Compostos secretados pelas linhagens CEN1403 e CEN1406 apresentaram efeito no crescimento de raízes, sendo que no caso de metabólitos produzidos pela linhagem CEN1403, verificou-se também influência no crescimento de parte aérea sem, no entanto, efeito sobre a proteção contra o patógeno. Já com metabólitos secretados pela linhagem CEN1389, verificou-se que, apesar da ocorrência do patógeno, houve desenvolvimento de plântulas (Figura 4). Os metabólitos secretados pela linhagem CEN1394 (L12) não mostraram ter efeito na

proteção dos bulbilhos, que foram completamente cobertos por estruturas de *S. cepivorum*, não diferindo visualmente do controle (Figura 5).



Foto: Maria Cléria Valadares-Ingliš

Figura 4 – Efeito dos metabólitos secretados pela linhagem CEN1389 de *T. tomentosum* na proteção de bulbilhos de alho inoculados com *S. clerotium cepivorum*.



Foto: Maria Cléria Valadares-Ingliš

Figura 5 – Metabólitos secretados pela linhagem CEN1394 de *T. hamatum* não apresentam efeito de proteção de bulbilhos de alho inoculados com *S. clerotium cepivorum*.

Efeito do extrato de alho no crescimento de linhagens de *Trichoderma*

A avaliação de linhagens de *Trichoderma* cultivadas na presença de extrato de alho mostrou grande diversidade de crescimento, quando comparadas ao controle. Todas as linhagens das espécies analisadas mostraram uma inibição inicial de crescimento até o terceiro dia, sendo que algumas espécies retomaram o crescimento, atingindo o nível semelhante aos controles. Algumas linhagens de *T. koningiopsis* apresentaram redução de crescimento em presença de extrato de alho, comparadas ao controle (Figura 3A), mostrando que linhagens de uma mesma espécie apresentam diferentes níveis de inibição, fato também observado para *T. asperellum* (Figura 3C), onde a linhagem CEN1418 apresentou total inibição, enquanto que a linhagem CEN1397 não foi inibida. Ambas as linhagens (CEN1387 e CEN1389) de *T. tomentosum* (Figura 3B) apresentaram redução de crescimento mesmo no quinto dia de crescimento, em comparação ao controle. De forma semelhante, as linhagens CEN1399 e CEN1401, de *T. longibrachiatum* (Figura 3E), apresentaram o mesmo nível de crescimento no quinto dia de cultivo. Destacam-se as linhagens de *T. harzianum* (Figura 3D) que apresentaram bom crescimento, tendo a linhagem CEN1416 se sobressaído por crescer no quarto dia após a inoculação, com vantagem em comparação à CEN1403 da mesma espécie. As linhagens de *T. hamatum* (Figura 3F) apresentaram comportamentos semelhantes, atingindo o crescimento máximo ao quinto dia, sem diferença entre linhagens e em relação ao controle.

Extratos de alho apresentam efeito significativo na redução do crescimento de vários patógenos de plantas, sendo que as respostas inibitórias variam entre organismos. Daniel et al. (2015) mostraram que *B. cinerea* e *Penicillium expansum* são inibidos por extrato aquoso de alho, enquanto que *Neofabraea alba* não teve o crescimento suprimido. Exudatos de raízes de alho apresentam efeito no crescimento de *Phytophthora capsici*, afetando o desenvolvimento de hifas, o conteúdo citoplasmático e a parede celular (Khan et al., 2011), sendo que os níveis de inibição variam com a cultivar de alho utilizada. Tedeschi et al. (2011) mostraram que extrato de alho apresenta efeito inibitório variável no crescimento de vários fungos fitopatogênicos, inibindo o crescimento de *S. rolfsii*, *R. solani*, *B. cinerea* sem, no entanto, apresentar efeito significativo em testes contra *F. oxysporum* e *T. longibrachiatum*. *Trichoderma longibrachiatum* apresenta grande potencial de uso no controle biológico de doenças, incluindo as causadas por *Meloidogyne incognita* (Zhang et al., 2015; Silva et al., 2017), *R. solani* (Sreenivasaprasad & Sreenivasaprad, 1993) e *Sclerotium rolfsii* em feijoeiro (Pacheco et al., 2016).

Castillo et al. (2011) mostraram que linhagens de *T. longibrachiatum* inibem o crescimento de *S. cepivorum* e *S. clerotiorum* em ensaios in vitro. Entretanto,

devido ao potencial efeito inibidor de extrato de alho em linhagens de *Trichoderma*, experimentos in vitro foram conduzidos neste trabalho para selecionar linhagens de diferentes espécies de *Trichoderma* para o controle de *S. cepivorum* em cultivos de alho e cebola. Ensaio de diferentes espécies em meios de cultivo contendo extrato de alho permitiram identificar linhagens que não são inibidas pelos referidos extratos e apresentam efeito positivo no crescimento de *A. sativum* infectados com o patógeno. A análise do crescimento do patógeno em extrato de alho mostrou que *S. cepivorum* não é afetado pelo extrato da planta alvo deste patógeno (Figura 4).

Conclusões

Das doze linhagens de *Trichoderma* pertencentes a seis diferentes espécies, analisadas quanto ao potencial de promover o crescimento de alho e ensaios de inibição por extrato de alho, destacou-se a linhagem CEN1416 da espécie *T. harzianum*. O presente trabalho mostra que diversos parâmetros necessitam ser avaliados para seleção de linhagens, uma vez que linhagens podem apresentar diferentes mecanismos de ação, quer seja na proteção contra o patógeno via inoculação de esporos do agente de biocontrole ou tratamento com seus metabólitos secundários, quer seja na indução de crescimento. No presente trabalho, a linhagem CEN1416 apresentou diferenças significativas de indução de crescimento da parte aérea e de raiz de alho em presença do patógeno, não sendo inibida por extrato de alho. Experimentos estão sendo conduzidos para avaliar outros parâmetros importantes para o desenvolvimento de biopesticida para uso no controle da podridão-branca do alho e da cebola, bem como para estudar o efeito de combinações de linhagens potencialmente diferentes quanto aos mecanismos de ação.

Agradecimentos

À FAPDF pelo apoio financeiro.

Referências

AALA, F., YUSUF, U. K., NULIT, R., REZAIE, S. (2014) Inhibitory effect of allicin and garlic extracts on growth of cultured hyphae. **Iran Journal of Basic Medical Science**, v. 17, p. 150-154, 2014.

BAYAN, L., KOULIVAND, P. H., GORJI, A. (2014) Garlic: a review of potential therapeutic effects. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 4, n. 1, p. 1-14, 2014.

BONTEMPO, A. F. **Seleção “in vitro” de isolados de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. em baixa temperatura de crescimento para o controle de *Sclerotium cepivorum***. 2016. 22 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Produção Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Rio Paranaíba. Disponível em:< <http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/7805>>. Acesso em: set. 2016.

CASTILLO, F. D. H., PADILLA, A. M. B., MORALES, G. G., SILLER, M. C., HERRERA, R. R., GONZALES, C. N. A., REYES, F. C. In vitro antagonistic action of *Trichoderma* strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v.6, n. 3, p. 410-417, 2011.

CLARKSON, J. P., PAYNE, T., MEAD, A., WHIPPS, J. M. Selection of fungal biological control agents of *Sclerotium cepivorum* for control of white rot by sclerotial degradation in UK soil. **Plant Pathology**, v. 51, n. 6, p. 735-745, 2002.

CLARKSON, J. P., MEAD, A., PAYNE, T., WHIPPS, J. M. Effect of environmental factors and *Sclerotium cepivorum* isolate on sclerotial degradation and biological control of white rot by *Trichoderma*. **Plant Pathology**, v. 53, n. 3, p. 353-362, 2004.

COLEY-SMITH, J. R. White rot disease of *Allium*: problems of soil-borne diseases in microcosm. **Plant Pathology**, v. 39, p. 214–222, 1990.

COVENTRY, E., NOBLE, R., MEAD, A., WHIPPS, J. M. Suppression of *Allium* white rot (*Sclerotium cepivorum*) in different soils using vegetable wastes. **European Journal of Plant Pathology**, v. 111, p. 101-112, 2005.

DANIEL, C. K., LENNOX, C. L., VRIES, F. A. (2015) In-vitro effects of garlic extracts on pathogenic fungi *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* and *Neofabraea alba*. **South African Journal of Science**, v. 111, n. 7/8, 2015.

DILBO, C., ALEMU, M., LENCHO, A., HUNDUMA, T. (2015) Integrated management of garlic White rot (*Sclerotium cepivorum* Berk) using some fungicides and antifungal *Trichoderma* species. **Plant Pathology Microbiology**, v. 6, n. 1, 2015.

ENTWISTLE, A. R. *Allium* white rot and its control. **Soil Use and Management**, v. 6. p. 201–209, 1990.

FULLERTON, R. A., STEWART, A. Chemical control of onion white rot (*Sclerotium cepivorum* Berk.) in the Pukekohe district of **New Zealand**. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 19, p. 121-127, 1991.

HUSSAIN, W. A., ELZAAWELY, A. A., EL SHEERY, N. I., ISMAEL, A. A., EL-ZAHABY, H. M. Biological control of onion white rot disease caused by *Sclerotium cepivorum*. **Environment, Biodiversity & Soil Security**, v. 1, p. 101-107, 2017.

KAY, S. J.; STWARD, A. Evaluation of fungal antagonists for control of onion white rot in soil box trials. **Plant Pathology**, v. 43, p. 371-377, 1994.

KAEWCHAI, S.; SOYTONG, K.; HYDE, K. D. Micofungicides and fungal biofertilizers. **Fungal Diversity**, v. 38, p. 25-50, 2009.

KHAN, M. A.; ZHIHUI, C.; XUEMEI, X.; KHAN, A. R.; AHMED, S. S. (2011) Ultrastructural studies of the inhibition effect against *Phytophthora capsici* of the root exudates collected from two garlic cultivars along with their qualitative analysis. **Crop Protection**, v. 30, n. 9, p. 1149-1155, 2011.

MASSOMEH, S-G., RAZAFSHA, M., ALLAMEH, A., RAZZAGHI-ABYANEH, M. (2003) Inhibitory effects of aqueous onion and garlic extracts on growth and keratinase activity in *Trichophyton mentagrophytes*. **Iranian Biomedical Journal**, v. 7, n. 3, p. 113-118, 2003.

PACHECO, K. R.; VISCARDI, R. S. M.; VASCONCELOS, T. M. M.; MOREIRA, G. A. M.; VALE, H. M. M.; BLUM, L. D. B. Efficacy of *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* and *T. reesei* against *Sclerotium rolfsii*. **Bioscience Journal**, v. 32, n. 2, p. 412-421, 2016.

R CORE TEAM (2017). **R**: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

SCOTT, A. J.; M. KNOTT. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.

SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; SHOKOOHAMIRI, M-R.; AMIRRAJAB, N.; MOGHADASI, B.; GHAJARI, A.; ZEINI, F.; SADEGHI, G.; RAZZAGHI-

ABYANEH. In vitro antifungal activities of *Allium cepa*, *Allium sativum* and ketoconazole against some pathogenic yeast and dermatophytes. **Fitoterapia**, v. 77, p. 321-323, 2006.

SAMMOUR, R. H.; MAHMOUD, Y. A. G.; MUSTAFA, A. A.; ALHOZIEM, R. Effective and cheap methods to control *Sclerotium cepivorum* through using Clorox or sulfur powder and/or calcium oxide. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, p. 904-911, 2012.

SREENIVASAPRASAD, S., SREENIVASAPRASAD, M. Efficacy of *Gliocladium virens* and *Trichoderma longibrachiatum* as biological control agents of groundnut root and stem rot diseases. **International Journal of Pest Management**, v. 39, n. 2, 1993.

SILVA, J. O., SANTANA, M. V., FREIRE, L. L., FERREIRA, B. S., ROCHA, M. R. Biocontrol agents in management of *Meloidogyne incognita* in tomato. **Ciência Rural**, v. 47, n. 10, 2017.

TEDESCHI, P., MAIETTI, A., BOGGIANI, M., VECCHIATI, G., BRANDOLINI, V. (2007) Fungitoxicity of lyophilized and spray-dried garlic extracts. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 42, p. 795-799, 2007.

TEDESCHI, P.; LEIS, M.; PEZZI, M.; CIVOLANI, S.; MAIETTI, A.; BRANDOLINI, V. Insecticidal activity and fungitoxicity of plant extracts and componentes of horseradish (*Armoracia rusticana*) and garlic (*Allium sativum*). **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 46, p. 486-490, 2011.

WALLOCK-RICHARDS, D.; DOHERTY, C. J.; DOHERTY, L.; CLARKE, D. J.; PLACE, M.; GOVAN, J. R. W., CAMPOPIANO, D. J. Garlic revisited: antimicrobial activity of allicin-containing garlic extracts against *Burkholderia cepacia* complex. **PLOS ONE**, 2014. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112726> >. Acesso em: ago. 2017.

ZHANG, S., GAN, Y., XU, B. Biocontrol potential of a native species of *Trichoderma longibrachiatum* against *Meloidogyne incognita*. **Applied Soil Ecology**, v. 94p. 21-29, 2015.

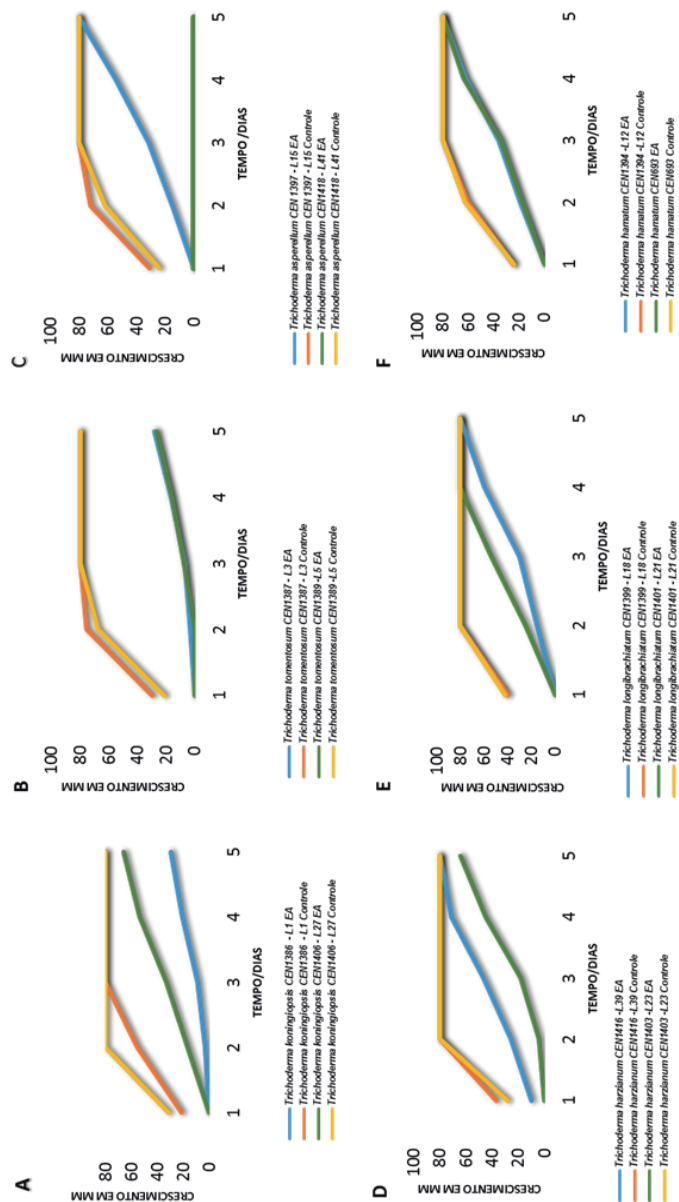


Figura 3: Crescimento de linhagens de *Trichoderma* em presença de extrato de alho. EA= extrato de alho

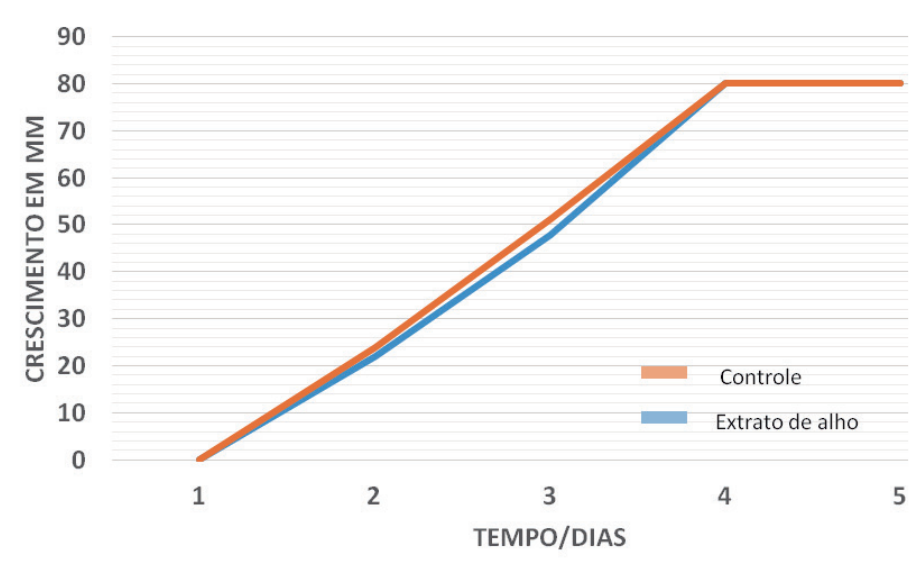


Figura 4: Crescimento de *S. cepivorum* em meio contendo extrato de alho



*Recursos Genéticos e
Biotecnologia*

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

