

Uso de *Trichoderma Harzianum* e condicionador orgânico de solo para controle da Podridão por *Sclerotium Rolfsii* em alho*

*Artigo extraído da Bioscience Journal, publicação da Universidade Federal de Uberlândia - UFU

Thiago Gomes de Sousa;

Mestrando em Agronomia pelo programa de pós-graduação da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília – UnB, Brasília, DF, Brasil. tgsousa@agronomo.eng.br

Luiz Eduardo Bassay Blum

Professor Adjunto, UnB, Brasília, DF, Brasil.

INTRODUÇÃO

O alho (*Allium sativum* L.) é uma das espécies cultivadas mais antigas. No Brasil, é uma das hortaliças mais consumida juntamente com a batata (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*), cebola (*Allium cepa*), tomate (*Lycopersicon esculentum*) e cenoura (*Daucus carota*). Rico em amido e substâncias aromáticas, o bulbo é composto por bulbilhos os quais, são a parte mais utilizável, devido seus valores nutricionais, medicinais e condimentares (FILGUEIRA, 2008).

Nos anos de 2008 e 2009, a população brasileira consumiu cerca de 21,5 milhões de caixas (10 kg por caixa) de alho in natura, e 22,3 milhões de caixas, respectivamente. Chegando a um consumo per capita de 1,1kg/ ano (LUCINI, 2008, 2009).

Sclerotium rolfsii é patógeno de mais 500 espécies de plantas, dicotiledôneas e monocotiledôneas, encontradas em 100 famílias suscetíveis. Há relatos de 30% (MONTESBELMONT et al., 2003) a 70% (MULLEN, 2001) perdas, nas mais diversas plantas, provocadas pelo patógeno. O patógeno é encontrado com mais frequência em regiões de clima tropical e subtropical. Em alho as lesões iniciais são encharcadas, seguindo podridão e murcha das folhas, o fungo produz abundante micélio branco nos tecidos infectados. Neste micélio são produzidos esclerócios de coloração branca que evoluem para uma coloração marrom-escura (PUNJA; RAHE, 1992; FERREIRA; BOLEY, 2006; FLORES-MOCTEZUMA et al., 2006; KWON, 2010).

O controle do patógeno é de difícil realização, não sendo eficiente por meio de uma única prática cultural ou química, como uso de fungicidas ou a rotação de cultural com plantas resistentes (SAHNI et al., 2008). Desta forma, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito de produto comercial a base de *Trichoderma harzianum* e fungicidas no controle da podridão causada por *Sclerotium rolfsii* em plantas de alho.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Micologia do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília (experimento “de germinação de esclerócios”, gerbox) e em casa de vegetação na Estação Experimental da Universidade de Brasília (experimento “in vivo”).

Obtenção dos isolados

Os isolados de *Sclerotium rolfsii* (UB 193 e UB 686) foram obtidos na coleção de micologia da Universidade de Brasília. Cada isolado foi usado nos experimentos *in vitro* e *in vivo*. Antes da realização dos experimentos, os esclerócios foram inoculados em bulbilhos de alho e colocados em câmaras úmidas constituídas de gerbox com papel toalha umedecido no fundo e com lâminas de vidro para evitar o contato dos bulbilhos com o papel toalha umedecido (12h de luz, $23 \pm 3^\circ\text{C}$). Os esclerócios produzidos foram recuperados e colocados em placas de Petri com meio de cultura (BDA). Logo após as placas foram colocados em câmara de incubação (luz por 12h a $24 \pm 1^\circ\text{C}$) por 15 dias. Posteriormente, os esclerócios produzidos foram coletados e armazenados em placas de Petri até o uso. Os produtos usados à base de *Trichoderma* foram os seguintes: *Trichoderma harzianum* (Trichodermil SC, 2.109 esporos.ml-1, suspensão concentrada) e condicionante de solo adicionado de *T. harzianum* (Ribumin T5, concentração estimada de 2.105 esporos.g-1.).

Análise de solo

O solo utilizado nos experimentos foi um latossolo vermelho com as seguintes características químicas e físicas: pH = 5,2, P = mg.dm-3 = 0,5 ppm, K = cmolc.dm-3 = 0,13 mE.100mL-1, Ca = cmolc.dm-3 = 0,6 mE.100mL-1, Mg = cmolc.dm-3 = 0,1 mE.100mL-1, Al = cmolc.dm-3 = 0,0 mE.100mL-1, V = 20%, matéria orgânica = 17,7 g/kg, areia = 250g/kg, silte = 200 g/kg, e argila = 550 g/kg. Para os experimentos de germinação de esclerócios e *in vivo* o solo foi esterilizado por 1 hora, a 1 atm, a 121°C antes de ser utilizado.

Teste de germinação de esclerócios

Os experimentos foram conduzidos em caixas plásticas (gerbox) sob luz de 12h a 26°C ($25^\circ - 27^\circ\text{C}$). Em cada gerbox colocou-se 200g de solo, o solo foi umedecido com 75ml de água destilada esterilizada. Sobre a superfície do solo em cada caixa foram colocados 25 esclerócios. Sobre cada esclerócio foram aplicados os seguintes tratamentos: 100µl *Trichoderma harzianum* (Trichodermil SC, 106 conídios.ml-1), 100µl de procimidona (Sumilex, 150g.100l-1 de água), 10 mg de condicionador de solo (Ribumin, 1000kg.ha-1), 10 mg de condicionador de solo + *T. harzianum* (Ribumin T5, 1000kg.ha-1), na testemunha foram adicionados 100µl por esclerócio de água esterilizada.

O número de esclerócios germinados e não germinados foi avaliado diariamente. Nos tratamentos que continham agentes biológicos de controle foi considerado não germinado o esclerócio totalmente coberto pelo biocontrolador (CLARKSON et al., 2002). Os experimentos (UB193 e UB 686) foram montados em um delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições.

Teste *in vivo*

Foram plantados dois bulbilhos por vaso (10 vasos por tratamento) em cada experimento (UB193e UB686), 15 dias após o plantio foram depositados dois esclerócios por planta e sobre eles foram aplicados os tratamentos 100µl de água, 100µl de procimidona (Sumilex, 150 g.100l-1), 100µl de tiofanato metílico (Support, 100ml.100l-1), 100µl de *Trichoderma harzianum* (Trichodermil SC, 2.106 conídios.ml-1), 10mg de condicionador de solo (Ribumin, 1000 kg.ha-1), 10 mg de condicionador de Solo + *Trichoderma harzianum* (Ribumin T5,1000 kg.ha-1). Após a aplicação os

vasos foram cobertos com sacos plásticos por 24h, segunda a metodologia modificada de Blum et al. (2003).

Utilizaram-se vasos plásticos pretos (1,7 kg de solo) com solo esterilizado, fertilizado de acordo com a análise de solo e recomendações da EMBRAPA (SOBRINHO et al., 1993) para a cultura (500 kg.ha⁻¹ de superfosfato simples, 102 kg.ha⁻¹ de cloreto de potássio, 15 kg.ha⁻¹ de bórax, 50 kg.ha⁻¹ de sulfato de zinco, 200 kg.ha⁻¹ de sulfato de magnésio e 198 kg.ha⁻¹ de uréia dividida em 2 aplicações, sendo metade no plantio e metade aos 45 dias após plantio) e com pH corrigido para 6,5 (2,237 t.ha⁻¹).

As plantas foram cortadas a 1 cm do solo, as partes aéreas foram retiradas e solo de cada vaso foi depositado em um recipiente com 5 litros de água. A parte radicular foi retirada e lavada na torneira, em seguida foi acondicionada em sacos de papel, a parte aérea foi acondicionada do mesmo modo. Todos os sacos com as partes das plantas foram colocados em estufa com ventilação forçada a 65°C para posterior determinação do peso de matéria seca, as partes radiculares foram retiradas após 48h, as partes aéreas após 72h e todos foram pesados, segundo método Tosi et al. (1999). O solo em cada recipiente foi misturado manualmente por 1 min e os esclerócios do sobrenadante foram coletados com um peneira (0,6 mm). A operação de mistura e coleta do sobrenadante foi repetida 3 vezes em cada vaso, segundo a método modificado de Rodriguez-Kabana et al. (1974).

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (F_{0,05}) e após comprovação da significância as médias foram comparadas pelo teste de Fisher (P_{0,05}). Para a análise da porcentagem de esclerócios germinados e do percentual de plantas de alho infectada com podridão por *Sclerotium rolfsii*, os dados originais foram transformados em $\arcsen \sqrt{X/100}$. Para a análise do número de esclerócios os dados foram transformados em \sqrt{X} . Foi utilizado o software (SigmaStat 3.5) para processamento das análises estatísticas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tratamento somente com *T. harzianum* apresentou a maior redução no percentual de germinação dos esclerócios, com um alto percentual de parasitismo (93,6% no isolado UB686 e 51,6% no isolado UB193), no 15º dia após o tratamento (Tabela 1).

Tabela 1

Os tratamentos com *T. harzianum* diferiram significativamente da testemunha (esclerócios tratados apenas com água). O condicionador de solo+*T.harzianum* apresentou uma menor formação de novos esclerócios (dados não apresentados), já os tratamentos com procimidona e somente com o condicionador de solo estimularam o crescimento de forma radial das hifas.

Madi et al. (1997) relatam que o alto percentual de parasitismo de *S. rolfsii* por *Talaromyces flavus* teve uma relação com a degradação da melanina e a redução da produção de novos esclerócios. Henis et al. (1983) afirmaram que para definir a eficiência dos biocontroladores, o parasitismo deveria ser considerado o mecanismo mais importante. O condicionador de solo quando aplicado de forma separada estimulou

a germinação dos esclerócios, porém o mesmo aplicado com *T.harzianum* reduziu a germinação dos esclerócios no 15º dia após o tratamento, e reduziu o número de plantas infectadas e o número de esclerócios (teste *in vivo*). Segundo relatos de Bettioli et al. (1997) substratos enriquecidos com turfa apresentaram uma maior severidade da doença e percentagem de tombamento causada por *Pythium ultimum* em pepino.

Os dados observados nos testes “*in vivo*” reforçam em parte os resultados apresentados nos experimentos de germinação de esclerócios, onde houve um controle mais eficaz do patógeno (UB 686) no tratamento com *T. harzianum* e um maior desenvolvimento do *S. rolfisii* nos tratamentos com fungicidas e condicionador de solo.

Os resultados apresentados na Tabela 2 mostram menor percentual de plantas infectadas no tratamento com condicionador de solo + *T.harzianum*. Os tratamentos com *T. harzianum* apresentaram um maior redução no número de plantas infectadas, eles não diferiram entre si, porém diferiram significativamente da testemunha com patógeno (UB 193). Wells et al. (1972) relataram em amendoim e tomate o controle do *S.rolfsii* por *T. harzianum*, chegando a 100% de plantas saudáveis. Segundo Menezes et al. (2004) com condições de solo adequadas (pH, textura e umidade) e inexistência de fatores bióticos desfavoráveis, os biocontroladores têm a capacidade de crescer e se multiplicar na rizosfera, controlando o patógeno, antes mesmo deste penetrar no hospedeiro.

Tabela 2

Assim como nos testes de germinação de esclerócios os tratamentos com *T. harzianum* apresentaram os melhores resultados, promovendo aumento significativo do ganho de massa seca de raiz e parte aérea, e a diminuição do número de esclerócios capturados por quilo de solo, quando comparados com a testemunha com patógeno (Tabela 3). Os tratamentos com fungicidas e o somente com condicionador de solo não diferiram da testemunha com patógeno em todas as variáveis avaliadas. Conforme mostrado nas Tabelas 2 e 3 o emprego do condicionador de solo + *T. harzianum* proporcionou uma redução no percentual de plantas infectadas e no número de esclerócios capturas por quilo de solo. O tratamento somente com *Trichoderma* apresentou resultado semelhante aos citados acima somente no segundo experimento.

Tabela 3

Pelos dados obtidos neste verificou-se uma redução da podridão por *Sclerotium rolfisii* em alho com o uso de *T. harzianum* com condicionador de solo adicionado de *T. harzianum*. O controle experimental sem tratamentos e com *S. rolfisii* apresentou 90% e 60% de plantas com podridão pelos isolados 193 e 686 do patógeno, respectivamente, enquanto que os tratamentos com *T. harzianum* com condicionador de solo apresentaram 40% e 20% de doença, respectivamente (Tabela 2). Uma das possíveis razões para a redução da doença seria um aumento do parasitismo nos esclerócios (HENIS et al., 1983; MADI et al., 1997).

O número de esclerócios teve forte correlação positiva, para os dois isolados de *S.rolfsii* ($r = 0,817$; $P=0,001$ e $r = 0,823$; $P=0,001$) com o número de plantas infectadas (Tabela 4) ao final do ciclo da cultura de alho, ou seja, quanto maior o número de esclerócios, maior o número de plantas infectas no final do ciclo da cultura de alho. Já a massa de raízes e o peso da parte aérea tiveram uma correlação negativa tanto com o número de esclerócios e com o número de plantas infectadas.

Tabela 4

No presente estudo o condicionador de solo adicionado de *T. harzianum* apresentou uma redução do número de planta infectada e no número de esclerócios capturas por quilo de solo, demonstrando que a inoculação do *Trichoderma* em um substrato que favoreça seu crescimento e desenvolvimento auxilia no aumento da eficiência do controle. Semelhantemente, todavia usando farelo de trigo com veículo para *Trichoderma*, Elad *et al.* (1980) obtiveram uma redução 20% do número de plantas tomate infectadas por *S. rolfsii*, além de uma maior eficiência de controle aplicando o *T. harzianum* inoculado em farelo ao invés da aplicação suspensão de conídios. Segundo Kleifeld e Chet (1992) a turfa é um reservatório alimentar para o *Trichoderma*, justificando assim a vantagem da turfa inoculada com *Trichoderma* sobre a suspensão de conídios. Em outros trabalhos como o de Maplestone *et al.* (1991) os tratamentos com turfa inoculada *Trichoderma harzianum* apresentaram uma menor percentagem de plantas de alface tombadas e folhas apodrecidas em relação a testemunha somente com *Rhizoctoniasolani*.

Contrariamente, Paula Júnior *et al.* (2009) obtiveram um melhor resultado no tratamento da *Sclerotinia sclerotiorum* com procimidona do que com *Trichoderma harzianum*, onde as aplicações em campo do fungicida aumentou a produção em 32% e o *Trichoderma* não aumentou a produção e nem reduziu a quantidade de doença. Em nossos dados, o tratamento com procimidona não se diferenciou significativamente da testemunha com o patógeno em todas as variáveis analisadas, demonstrando que o fungicida na concentração utilizada não é capaz de promover o controle da podridão causada por *S. rolfsii*.

Todavia, Pérez-Moreno *et al.* (2009) relataram que os fungicidas procimidona, iprodione e thiabendazole não inibiram o crescimento de *Sclerotium rolfsii* e não reduziram a produção de esclerócios de alguns isolados, possivelmente devido a utilização indiscriminada destes fungicidas pelos produtores das regiões onde foram coletados os isolados.

CONCLUSÕES

Os tratamentos a base de *T. harzianum* foram mais eficientes no controle da podridão do alho causada *S. rolfsii*.

O condicionador de solo na forma isolado favoreceu a germinação e produção de novos esclerócios do patógeno; porém, desfavoreceu quando combinado a *T. harzianum*. Os fungicidas, tiofanato metílico e procimidona não controlaram o patógeno.

AGRADECIMENTOS

A Fundação Universidade de Brasília, CNPq e CAPES pelas bolsas de estudo, à ANAPA pelo fornecimento de bulbilhos de alho, à ITAFORTE e à TECHNES pela doação dos produtos biológicos testados.

REFERÊNCIAS

BETTIOL, W.; MIGHELI, Q.; GARIBALDI, A. Controle, com material orgânico, do tombamento do pepino causado por *Pythium ultimum* trow. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v. 32, n.1, p. 57-61, 1997.

BLUM, L. E. B.; AMARANTE, C. V. T.; ARIOLI, C. J.; GUIMARÃES, L. S.; DEZANET, A.; HACK NETO, P.; SCHEIDT, F. R. Reação de genótipos de *Phaseolus vulgaris* à podridão do colo e ao oídio. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 96-100. jan./fev. 2003.

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

ELAD, Y.; CHET, I.; KATAN, J. *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, v. 70, p. 119-121, 1980.

FERREIRA, A. S.; BOLEY, R. A. **Sclerotium rolfsii**. Crop Knowledge Master, 2006. Disponível em: <<http://hbs.bishopmuseum.org/botany/taro/key/HawaiianKalo/Media/Html/adobe/dryrot.pdf>>. Acesso em: 4 abr. 2010.

FILGUEIRA, F. A. R. **Manual de Olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3. ed. Viçosa: UFV, 2008. Cap. 15.

HENIS, Y.; ADAMS, P. B.; LEWIS, J. A.; PAPAVIDAS, G. C. Penetration of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 73, n. 7, p. 1043-1046, 1983.

KLEIFELD, O.; CHET I. *Trichoderma harzianum* - interaction with plants and effect on growth response. **Plant and Soil**, v. 144, n. 2, p. 267-272, 1992.

KWON, J.H. Stem rot of garlic (*Allium sativum*) caused by *Sclerotium rolfsii*. **Mycobiology**, v. 38, n. 2, p. 156-158, 2010.

LUCINI, M. A. **Importações do alho no Brasil em 2008**. 2008. Disponível em: <<http://www.anapa.com.br/principal/images/stories/documentos/importacoes-de-alho-no-brasil-2008.pdf>>. Acesso em: 2 dez. 2010.

LUCINI, M. A. **Importações do alho nobre no Brasil em 2009**. 2009. Disponível em: <<http://www.anapa.com.br/principal/images/stories/importacoes/dez2009.pdf>>. Acesso em: 2 dez. 2010.

MADI, L.; KATAN, T.; KATAN, J.; HENIS Y. Biological control of *Sclerotium rolfsii* and *Verticillium dahliae* by *Talaromyces flavus* is mediated by different mechanisms. **Phytopathology**, v. 87, p. 1054-1060, 1997.

MAPLESTONE, P. A.; WHIPPS, J. M.; LYNCH J. M. Effect of peat-bran inoculum of *Trichoderma* species on biological control of *Rhizoctonia solani* in lettuce. **Plant and Soil**, v. 136, p. 257-263, 1991.

MENEZES, M.; MACHADO, A. L. M.; SILVEIRA, M. C. V.; SILVA, R. L. X. Biocontrole de *Macrophomina phaseolina* com espécies de *Trichoderma* aplicadas no tratamento de sementes de feijão e no solo. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 1, p. 133-140, 2004.

MONTES-BELMONT, R.; NAVA-JUÁREZ, R. A.; FLORES-MOCTEZUMA, H. E. Hongos y nematodos em raíces y bulbos de cebolla (*Allium cepa* L.) en El Estado de Morelos, México. **Revista Mexicana de Fitopatología**, v. 21, n. 3, p. 300-304, 2003.

MULLEN, J. **Southern blight, southern stem blight, white mold**. 2001. Disponível em:

<<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/SouthernBlight.aspx>>. Acesso em: 31 ago. 2010.

PAULA JÚNIOR, T. J.; VIEIRA, R. F.; ROCHA, P. R. R.; BERNARDES, A.; COSTA, E. L.; CARNEIRO, J. E. S.; VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. Intensidade do mofo branco em feijão em função de densidade de plantas, frequência de irrigação, cobertura vegetal do solo, *Trichoderma* spp. E fungicidas. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 1, p. 44-48, 2009.

PÉREZ-MORENO, L.; VILLALPANDO-MENDIOLA, J. J.; CASTAÑEDA-CABRERA, C.; RAMIREZMALAGÓN, R. Sensibilidad in vitro de *Sclerotium rolfsii* Saccardo, a los fungicidas comúnmente usados parasu combate. **Revista Mexicana de Fitopatología**, v. 27, n. 1, p. 11-17, 2009.

PUNJA, Z. K.; RAHE, J. E. *Sclerotium*. In: SINGLETON, L. L.; MIHAIL, J. D.; RUSH, C. M. **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. St. Paul: Minnesota, APS Press, p. 166-170, 1992.

RODRIGUEZ-KABANA, R.; BACKMAN, P. A.; ELIZABETH, A. W. Determination of sclerotial populations of *Sclerotium rolfsii* in soil by a rapid floatation-sieving technique. **Phytopathology**, v. 64, p. 610-615, 1974.

SAHNI, S.; SARMA, B. K.; SINGH, K. P. Management of *Sclerotium rolfsii* with integration of nonconventional chemicals, vermicompost and *Pseudomonas syringae*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 24, p. 517-522, 2008.

SOBRINHO, J. A. M.; LOPES, C. A.; REIFSCHNEIDER, F. J. B.; CHARCHAR, J. M.; CRISÓSTOMO, L. A.; CARRIJO, O. A.; BARBOSA, S.. **A cultura do alho**. 1. ed. Brasília: EMBRAPA, 1993.

TOSI, P.; MATTOS, W. R. S.; TOSI, H., JOBIM, C. C.; LAVEZZO, W. Avaliação do capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) cultivar Taiwan A-148, ensilado com diferentes técnicas de redução de umidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 28, n. 5, p. 947-954, 1999.

WELLS, H.; BELL, D. K.; JAWORSKI, C. A. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrole for *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, v. 62, p. 442-447, 1972.