

**AUGUSTO NICOMEDES ANDRADE QUINTINO**

**DESINFESTAÇÃO ANAERÓBICA DO SOLO E INDUTORES DE GERMINAÇÃO  
DE ESCLERÓDIOS NO MANEJO DE *Stromatinia cepivora***

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

Orientador: Everaldo Antônio Lopes

Coorientador: Valdir Lourenço Junior

**RIO PARANAÍBA - MINAS GERAIS  
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Universidade Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba**

T

Q7d  
2023

Quintino, Augusto Nicomedes Andrade, 1998-  
Desinfestação anaeróbica do solo e indutores de  
germinação de escleródios no manejo de *Stromatinia cepivora* /  
Augusto Nicomedes Andrade Quintino. – Rio Paranaíba, MG,  
2023.

41 f.: il. (algumas color.).

Orientador: Everaldo Antônio Lopes.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Instituto de Ciências Agrárias, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvcrp.2023.007>

1. Desinfestação biológica do solo. 2. *Sclerotium cepivorum*. 3. *Allium* spp. I. Lopes, Everaldo Antônio, 1979-.  
II. Universidade Federal de Viçosa. Instituto de Ciências Agrárias. Mestrado em Agronomia (Produção Vegetal).  
III. Título.

631.4

**AUGUSTO NICOMEDES ANDRADE QUINTINO**

**DESINFESTAÇÃO ANAERÓBICA DO SOLO E INDUTORES DE GERMINAÇÃO  
DE ESCLERÓDIOS NO MANEJO DE *Stromatinia cepivora***

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

APROVADA: 28 de junho de 2023.

Assentimento:



Documento assinado digitalmente

**AUGUSTO NICOMEDES ANDRADE QUINTINO**

Data: 10/11/2023 09:16:30-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Augusto Nicomedes Andrade Quintino  
Autor



Documento assinado digitalmente

**EVERALDO ANTONIO LOPES**

Data: 10/11/2023 14:55:20-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Everaldo Antônio Lopes  
Orientador

*Aos meus pais, irmã, amigos e todos  
aqueles que acreditaram em mim, dedico!*

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais e minha irmã.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação em Produção Vegetal no *campus* de Rio Paranaíba.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro no projeto.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA – Hortaliças) pela orientação e parceria nos experimentos.

Ao Grupo de Pesquisa em Fitopatologia Anton De Bary pelo apoio na realização das análises.

A todos que, de alguma forma, me apoiaram e/ou incentivaram no decorrer da Pós-Graduação.

## RESUMO

QUINTINO, Augusto Nicomedes Andrade, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2023. **Desinfestação anaeróbica do solo e indutores de germinação de escleródios no manejo de *Stromatinia cepivora***. Orientador: Everaldo Antônio Lopes. Coorientador: Valdir Lourenço Júnior.

Os fungos fitopatogênicos habitantes de solo são uma das maiores preocupações na agricultura, causando perdas em diversas espécies de plantas, limitando o cultivo em áreas infestadas, principalmente em culturas de alto valor de investimento, a exemplo o alho (*Allium sativum* L.). A podridão-branca, causada pelo fungo *Stromatinia cepivora*, é uma das doenças mais devastadoras do alho em todo o mundo, principalmente devido ao seu difícil controle e longevidade dos escleródios do patógeno no solo. Devido à ineficiência de muitos métodos de manejo, estudos por alternativas tem se intensificado. Uma técnica promissora é a desinfestação anaeróbica do solo (DAS) que já demonstrou eficiência no controle de diversos patógenos de solo; porém, pouco se sabe quanto ao efeito sobre *S. cepivora* em condições de campo. Outra forma de manejo dessa doença é o uso de estimulantes da germinação de escleródios. A hipótese deste trabalho é que a integração de ambas as práticas reduz a densidade de inóculo de *S. cepivora* no solo. Experimentos foram conduzidos em área naturalmente infestada pelo fungo, onde foram avaliados os efeitos de etanol, sacarose, composto orgânico, palha de café como fontes de carbono para a DAS com período de incubação de dez semanas. Os estimulantes de germinação avaliados foram extrato aquoso de alho (20%; m:v) e um produto formulado à base de alicina. A DAS não reduziu o número de escleródios totais no solo; porém, reduziu a densidade de escleródios viáveis em 63,3% quando etanol foi usado como fonte de carbono e em 48,8%, com o uso de sacarose. Houve incremento de escleródios chochos de 333, 337, 1133 e 1266% ao utilizar composto orgânico, etanol, palha de café e sacarose, respectivamente. A aplicação somente de extrato de alho reduziu o número de escleródios totais em 61,8% e de viáveis em 38,3%, já a alicina reduziu em 75,0 e 64,7%, respectivamente. Na integração da DAS com indutores de germinação, o número de escleródios chochos aumentou na faixa de 42,9% no tratamento com palha de café + alicina e em até 1700% ao utilizar composto orgânico + extrato de alho. A densidade de escleródios viáveis foi reduzida em 38% com composto orgânico + extrato de alho e em 100% com composto orgânico +

alicina. Em relação ao número de escleródios totais, a redução foi de 61,5% com composto orgânico + alicina e até 80% com sacarose + alicina. Os resultados mais promissores foram obtidos pela integração da DAS com etanol ou sacarose com a posterior aplicação de alicina. Assim, o uso integrado de DAS e indutores de germinação pode ser opção para o manejo de *S. cepivora*.

Palavras-chave: Desinfestação biológica do solo. *Sclerotium cepivorum*. *Allium* spp.

## ABSTRACT

QUINTINO, Augusto Nicomedes Andrade, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2023. **Anaerobic soil disinfestation and germination inducers in the management of *Stromatinia cepivora***. Adviser: Everaldo Antônio Lopes. Co-adviser: Valdir Lourenço Júnior.

The soilborne fungi are one of the major concerns in agriculture, causing losses in several species of plants and limiting the cultivation in infested areas, especially in crops with high investment value, such as garlic (*Allium sativum* L.). White rot, caused by the fungus *Stromatinia cepivora*, is one of the most devastating diseases of garlic worldwide, mainly due to its difficult control and longevity of sclerotia in the soil. Due to the inefficiency of many management methods, studies for alternatives have been intensified. One promising technique is anaerobic soil disinfestation (ASD), which has shown efficiency in the control of several soil pathogens, but little is known about the effect on *S. cepivora* under field conditions. Another strategy to manage this disease is the use of sclerotia germination stimulants. The hypothesis of this study is that the integration of both practices reduces the inoculum density of *S. cepivora* under field conditions. Experiments were conducted in an area naturally infested by the fungus, where the effects of ethanol, sucrose, organic compound, and coffee straw as carbon sources for ASD with incubation period of ten weeks. The germination inducers were aqueous garlic extract (20%, m/v) and a formulated product based on allicin. DAS did not reduce the number of total sclerotia in the soil but reduced the density of viable sclerotia by 63.3% with ethanol as carbon source in ASD and 48.8% using sucrose. There was an increase in germinated sclerotia by 333%, 337%, 1133% and 1266% when using organic compost, ethanol, coffee straw and sucrose as carbon sources, respectively. The application of garlic extract alone reduced the number of total sclerotia by 61.8% and of viable sclerotia by 38.3%, while allicin reduced it by 75.0 and 64.7%, respectively. When integrating ASD with germination inducers, the number of germinated sclerotia increased by 42.9% in the treatment with coffee straw + allicin and 1700% by using organic compost + garlic extract. The density of viable sclerotia was reduced by 38% with organic compost + garlic extract and by 100% with organic compost + allicin. Regarding the total number of sclerotia, the reduction was 61.5% with organic compost + allicin to 80% with sucrose + allicin. The most promising results were obtained through the integration of ASD with ethanol or sucrose, followed by the

application of allicin. Therefore, the integrated use of ASD and germination inducers may be an option for the management of *S. cepivora*.

Keywords: Biological soil disinfestation. *Sclerotium cepivorum*. *Allium* spp.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	10
REFERÊNCIAS .....	12
CAPÍTULO I - DESINFESTAÇÃO ANAERÓBICA DO SOLO E INDUTORES DE GERMINAÇÃO DE ESCLERÓDIOS NO MANEJO DE <i>Stromatinia cepivora</i> .....	14
1. INTRODUÇÃO .....	14
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	18
2.1. Escolha do local para a montagem do experimento .....	18
2.2. Quantificação de inóculo de <i>Stromatinia cepivora</i> .....	18
2.3. Fontes de carbono para uso na desinfestação anaeróbica do solo (DAS) ....	20
2.4. Preparo do extrato de alho.....	21
2.5. Avaliação química do extrato de alho e do produto à base de alicina.....	21
2.6. Efeito da DAS sobre escleródios de <i>Stromatinia cepivora</i> .....	22
2.7. Efeito da aplicação de compostos derivados do alho sobre escleródios de <i>Stromatinia cepivora</i> .....	23
2.8. Delineamento experimental e análise estatística .....	23
3. RESULTADOS .....	24
3.1. Análise química dos metabólitos do extrato aquoso de alho e da alicina .....	24
3.2. Experimentos em campo.....	25
4. DISCUSSÃO .....	33
5. CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS.....	38

## INTRODUÇÃO GERAL

Os fungos fitopatogênicos habitantes de solo são uma das maiores preocupações na agricultura em diversos sistemas de exploração, causando perdas em culturas econômicas ou de subsistência. A maioria desses organismos produz estruturas de resistência, capazes de perdurar no solo por vários anos, a exemplo dos clamidósporos de *Fusarium oxysporum*, escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia* spp, *Athelia* spp, *Stromatinia* spp. e microescleródios de *Macrophomina phaseolina* e de *Verticillium dahliae* (Bueno et al., 2007).

De forma geral, as doenças causadas por fungos habitantes do solo podem limitar o cultivo em áreas infestadas, principalmente no caso de culturas de alto valor de investimento, a exemplo do alho (*Allium sativum* L.). Uma das doenças mais devastadoras do alho e de outras plantas do gênero *Allium* é a podridão-branca, causada por *Stromatinia cepivora* Berk (sin = *Sclerotium cepivorum*). Perdas de até 100% podem ser observadas em locais contendo o patógeno, quando as condições ambientais são favoráveis ao patógeno (Crowe, 2008; Lourenço Jr. et al., 2018). O fungo pode sobreviver no solo por até 30 anos (Canedo, 2019) e esta característica dificulta muito o controle, ainda que a gama de hospedeiros do patógeno seja restrita a espécies de *Allium*.

O controle preventivo tem sido a principal medida adotada por produtores. Deve-se evitar a introdução de inóculo em áreas não infestadas por meio do uso de materiais de plantio saudáveis, limpeza de implementos e evitando o plantio de culturas hospedeiras em locais onde se sabe de sua presença, pois o controle químico é caro e pouco eficiente, geralmente utilizando produtos como metam sódio ou triazóis, e a rotação de culturas é impraticável devido a longevidade dos escleródios no solo (Lourenço Jr, 2017). Com isso, surgiu a necessidade de estudos de controles alternativos a este patógeno.

Uma possível alternativa promissora para o controle deste patógeno é a desinfestação anaeróbica do solo (DAS, em inglês *anaerobic soil disinfection-ASD*), que é uma opção ecológica à fumigação química do solo. Essa técnica consiste na incorporação ao solo de materiais orgânicos de fácil decomposição (relação C/N de 8-20:1), seguido da irrigação até a capacidade de campo e a cobertura do solo com plástico impermeável, pelo período de 2 a 10 semanas (Roskopf et al., 2014; Shennan et al., 2014).

Outra forma que vem sendo estudada para o manejo da podridão-branca é o uso de estimulantes da germinação de escleródios (Coventry et al., 2002). O fungo germina em condições de solo úmido, temperatura de 10 a 20 °C e na presença de exsudatos radiculares de *Allium* spp. Assim, a aplicação repetida de compostos químicos similares aos liberados na rizosfera por plantas do gênero *Allium* pode estimular a germinação dos escleródios desde que haja as condições ideais para o desenvolvimento do fungo e, na ausência da planta hospedeira, os escleródios irão germinar e morrerão em pouco tempo.

Diversos trabalhos já foram realizados, em ambiente controlado, pelo Grupo de Pesquisa em Fitopatologia Anton de Bary da Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Rio Paranaíba e demonstraram efeito significativo da DAS no manejo de *S. cepivora* (Canedo, 2019; Quintino, 2021; Quintino, 2023). Porém, nenhum trabalho foi realizado em campo.

Com isso, o objetivo central deste trabalho foi validar em campo a eficiência e a aplicabilidade da associação das técnicas de desinfestação anaeróbica do solo e a indução de germinação artificial sobre *S. cepivora*, avaliando o efeito de diferentes fontes de carbono e de compostos similares aos exsudados pela planta do alho.

## REFERÊNCIAS

BUENO, C.J.; AMBRÓSIO, M.M. DE Q.; SOUZA, N.L. Produção e avaliação da sobrevivência de estruturas de resistência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.1, p.47-55. 2007

CANEDO, E. J. Potencial de redução da viabilidade de *Meloidogyne javanica* e *Stromatinia cepivora* por meio da desinfestação anaeróbica do solo. 52 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Produção Vegetal) - **Universidade Federal de Viçosa**, Rio Paranaíba. 2019.

COVENTRY, E.; NOBLE, R.; MEAD, A.; WHIPPS, J.M. Control of Allium White Rot (*Sclerotium cepivorum*) with composted onion waste. **Soil Biology and Biochemistry**. 34,1037–1045. 2002.

CROWE F. J. White rot. In: SCHWARTZ HF, MOHAN SK (Ed.) Compendium of onion and garlic diseases. **The American Phytopathological Society**, St. Paul, USA. p. 22-26. 2008.

LOURENÇO JR, V. Podridão branca em alho e cebola: doença destrutiva, mas de pouca importância para os fitopatologistas. **Embrapa Hortaliças**, p. 27-29. 2017.

LOURENÇO JR, V., RESENDE, F. V.; OLIVEIRA, V. R. DE; MELO, R. A. DE C.; MOITA, A. W.; LOPES, E. A. Efeito de agentes de biocontrole, extrato de planta e fungicidas no progresso da podridão branca em alho. Brasília, DF; 20 p.: il. color. (**Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Hortaliças**, ISSN 1677-2229; 168). 2018.

QUINTINO, A. N. A., CANEDO, E. J., LOPES, E. A., VIEIRA, B. S., LOURENÇO JUNIOR, V., PARREIRA, D. F., NEVES, W. S. Anaerobic soil disinfestation with ethanol or sucrose reduces the viability of *Meloidogyne javanica* and *Stromatinia cepivora*. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, 45(1), e64832. 2023.

QUINTINO, A. N. A., LOPES, E. A.; FARIA, V. R., SOUZA, B. L. Desinfestação anaeróbica do solo para o manejo de *Meloidogyne* spp. e *Stromatinia cepivora* e extrato de alho para indução de germinação de *S. cepivora*. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) - **Universidade Federal de Viçosa**. 2021.

ROSSKOPF, E. N.; BURELLE, N.; HONG, J.; BUTLER, D.M.; NOLING, J.W.; HE, Z.; BOOKER, B.; SANCES, S. Comparison of anaerobic soil disinfestation and drip-applied organic acids for raised-bed specialty crop production in Florida. **Acta Horticulturae**, 1044: 221–228. 2014.

SHENNAN, C.; MURAMOTO, J.; LAMERS, J.; MAZZOLA, M.; ROSSKOPF, E.N.; KOKALIS-BURELLE, N.; MOMMA, N.; BUTLER, D.M.; KOBARA, Y. Anaerobic soil disinfestation for soil borne disease control in strawberry and vegetable systems: current knowledge and future directions. **Acta Horticulturae**, 1044: 165–175. 2014.

## CAPÍTULO I - DESINFESTAÇÃO ANAERÓBICA DO SOLO E INDUTORES DE GERMINAÇÃO DE ESCLERÓDIOS NO MANEJO DE *Stromatinia cepivora*

### 1. INTRODUÇÃO

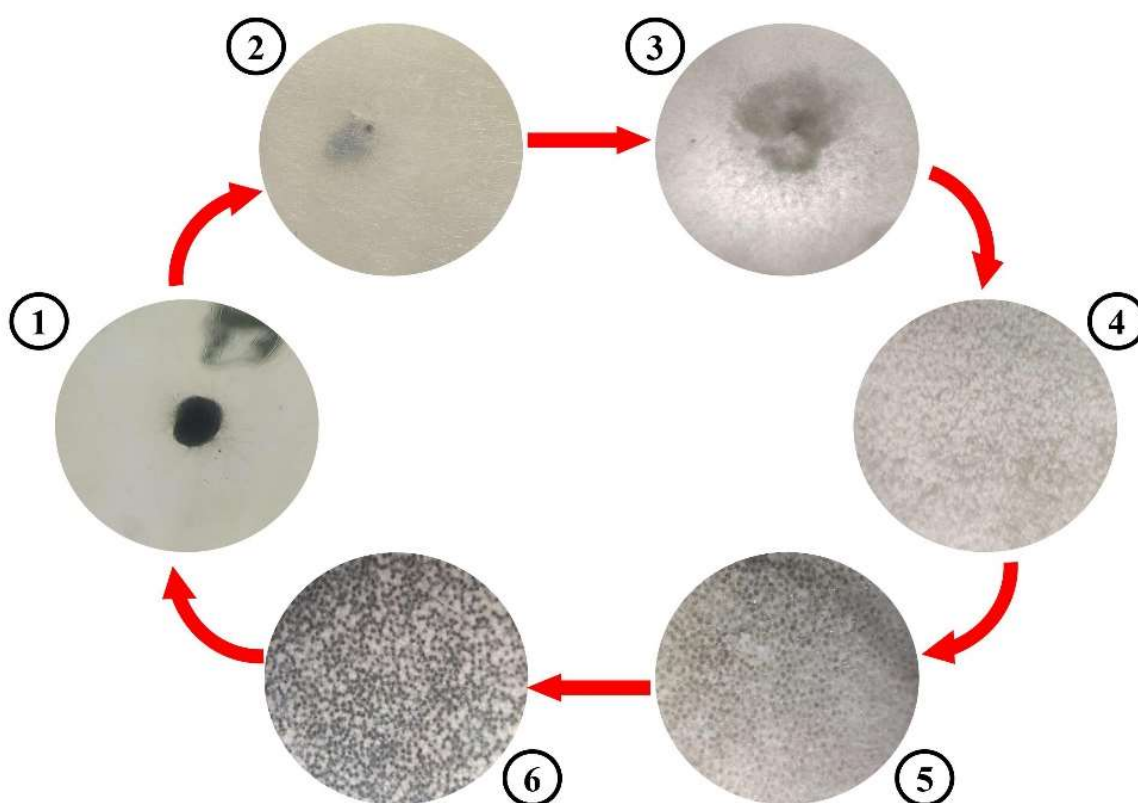
A cultura do alho (*Allium sativum* L.) é uma das principais hortaliças cultivadas e consumidas no Brasil. Em 2020, a produção nacional atingiu 155 mil toneladas e cerca de 90% do total é produzida por quatro estados, liderado por Minas Gerais, com 39% da produção, seguido por Goiás com 34,4%, Santa Catarina com 8,5% e Rio Grande do Sul com 7,7%. As maiores produtividades são observadas em Minas Gerais e Goiás, atingindo média entre 12 e 16 toneladas por hectare (Conab, 2021). É uma cultura de alto valor agregado e custos elevados, chegando em 2021 a valores próximos de R\$120.000,00 para produzir um hectare (Conab, 2021).

A podridão-branca, também conhecida como mofo-branco, é uma das doenças mais devastadoras do alho e da cebola (*Allium cepa* L.). É causada pelo fungo *Stromatinia cepivora* (Berk.) (sin = *Sclerotium cepivorum*). Perdas de até 65% já foram relatadas em países produtores como Reino Unido e Canada; enquanto no Brasil e mesmo México essas perdas podem chegar a 100% (Domingos et al, 2015).

*Stromatinia cepivora* é um ascomiceto pertencente à ordem *Helotiales* e família *Sclerotiniaceae*. Tem como característica a produção de micélio estéril e escleródios pequenos, de formato esférico e cor preta, devido à deposição de melanina, que atua como defesa ao dessecamento (Fuga et al., 2012). A doença se manifesta no campo em reboleiras, onde as plantas apresentam sintomas de clorose, redução do porte, morte das folhas velhas e apodrecimento de bulbos e raízes, podendo-se observar a presença de micélios brancos e escleródios negros (Lourenço Jr., 2017). O patógeno permanece no solo na ausência de uma planta hospedeira na forma dos escleródios, chegando a sobreviver por mais de 20 anos (Coley-Smith & Parfitt, 1986; Coley-Smith et al., 1990). Assim como diversos patógenos de solo, a dispersão de *S. cepivora* via transporte de solo infestado inclui água de irrigação, bulbilhos sujos com solo aderido, máquinas e implementos agrícolas (Lourenço et al., 2018).

Os escleródios produzidos pelo fungo, após superar o período de dormência constitutiva de um a três meses, germinam somente na presença de estímulos gerados por exsudatos das plantas hospedeiras (Coley-Smith et al., 1987). Esse

estímulo ocorre devido à degradação de sulfóxidos liberados pelas raízes de espécies de *Allium*, realizada por microrganismos presentes no solo, resultando na liberação de compostos voláteis, incluindo tiol e sulfetos (Coley-Smith & Parfitt, 1986). Assim, na presença de tal estímulo e havendo as condições ideais de temperatura (13-18 °C) e umidade (40-60% da capacidade de campo) os escleródios germinam (Domingos, 2015), produzindo hifas brancas que ocupam grande parte do bulbo do hospedeiro. Posteriormente, as hifas se enovelam, dando origem a novos escleródios, finalizando com a deposição de melanina no exterior da estrutura (Figura 1).



**Figura 1.** Ciclo de germinação e multiplicação do escleródio de *Stromatinia cepivora* cultivado em meio de cultura em laboratório, no período de 15 dias. 1 – O escleródio inicia seu processo de germinação, emitindo as primeiras hifas; 2 – As hifas se proliferam; 3 – Toda área do meio de cultura é colonizada pelas hifas; 4 – Início do enovelamento das hifas para a formação dos escleródios; 5 – Início da deposição de melanina nos primeiros escleródios formados; 6 – Por fim, a formação total dos escleródios.

A severidade da doença é relacionada diretamente com o número de escleródios no solo. Perdas elevadas são observadas com poucos escleródios no solo (Crowe et al., 1980). Por exemplo, a densidade de inóculo de 0,1 escleródio.L<sup>-1</sup> pode resultar em perdas econômicas; apenas 1 escleródio.L<sup>-1</sup> causa perda de 30 a 60% da produção (Crowe et al., 1980), populações acima de 10 escleródio.L<sup>-1</sup> podem causar perda total da área (Elshahawy et al., 2019).

Muitos métodos têm sido estudados para o controle da podridão-branca, incluindo o uso de fungicidas, fumigantes de solo (como metam-sódico), solarização, agentes de controle biológico, estimulantes de germinação e compostagem de resíduos da produção de cebola. Porém, nenhum método pode erradicar ou controlar eficientemente *S. cepivora* (Pontin et al., 2015). Assim, devido ao alto custo de controle e a eficiência variável, a cultura vem apresentando um caráter de nomadismo, aumentando cada vez mais a procura por áreas não infestadas (Fuga et al., 2012).

Uma possível alternativa ecológica para o manejo de *S. cepivora* é a desinfestação anaeróbica do solo (DAS, em inglês *anaerobic soil disinfestation* – ASD). A técnica foi desenvolvida no final dos anos 1990 e início dos anos 2000 (Blok et al., 2000; Shinmura, 2000) e tem sido utilizada para o manejo de diversos patógenos do solo, incluindo *Fusarium*, *Verticillium*, *Rhizoctonia*, *Athelia*, *Sclerotinia*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Macrophomina*, *Ralstonia*, os fitonematoides do gênero *Meloidogyne* spp. e *Pratylenchus* spp., além de insetos e plantas daninhas (Goud et al., 2004; Roskopf et al., 2014; Shennan et al., 2014; Shrestha et al., 2016; Guo et al., 2017; Shrestha et al., 2018). Assim, essa técnica pode reduzir a viabilidade de *S. cepivora*.

A DAS consiste na incorporação ao solo de materiais orgânicos de fácil decomposição (relação C/N de 8-20:1), seguido da irrigação até a capacidade de campo e a cobertura do solo com plástico impermeável, por um período de 2 a 10 semanas (Roskopf et al., 2014; Shennan et al., 2014). Assim, há o estímulo de crescimento e respiração rápida da microbiota, reduzindo o oxigênio disponível no solo resultando em condições anaeróbicas, que estimulam a atividade de microrganismos anaeróbicos facultativos (Roskopf et al., 2014; Shennan et al., 2014; Shrestha et al., 2016). O acúmulo de compostos tóxicos provenientes da decomposição anaeróbica (ácidos acético, butírico e propiônico, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S, CH<sub>4</sub> e N<sub>2</sub>O), antagonismo exercido por organismos anaeróbicos, falta de oxigênio e a combinação de todos esses fatores são os principais mecanismos de ação da técnica

contra fitopatógenos (Runia et al., 2014; Shennan et al., 2014; Strauss; Kluepfel, 2015).

A fonte de carbono a ser utilizada na DAS pode ser líquida ou sólida. Porém, a líquida penetra nos poros do solo e é geralmente mais eficiente (Momma et al., 2013; Shrestha et al., 2016). A seleção da fonte de carbono desempenha importante papel na estrutura da comunidade microbiana do solo, afetando populações distintas durante a DAS (Hewavitharana et al., 2014). Devido ao fácil acesso e um custo relativamente barato, é comum o uso de etanol e sacarose (açúcar cristal diluído em água) como fontes de carbono.

O uso de produtos naturais para o controle de fitopatógenos é outra alternativa ao uso dos fungicidas sintéticos e as pesquisas nesta área vêm sendo intensificadas, já que esses produtos são biodegradáveis e não tóxicos (Pontin et al., 2015). O extrato de alho tem sido utilizado como uma alternativa aos agrotóxicos convencionais na agricultura (Chen et al., 2013). O alho possui propriedades fungicidas, bactericidas e repelentes de insetos, o que o torna uma opção viável para o controle de pragas e doenças nas plantações. O extrato de alho é eficaz no controle de pragas e doenças fúngicas em plantas de tomate (Singh et al., 2019). Os compostos sulfurados e fenólicos no alho possuem atividades antioxidante, antimicrobiana e repelentes contra insetos (Singh et al., 2019). A utilização de extrato de alho na agricultura é uma prática promissora, devido à sua baixa toxicidade e à possibilidade de ser produzido de forma sustentável a partir de resíduos de alho.

Além do efeito tóxico direto contra patógenos e insetos, o extrato de alho e compostos derivados da planta, como aliina ou alicina (que são sulfóxidos encontrados naturalmente no alho fresco), podem estimular a germinação de escleródios de *S. cepivora*, desde que a temperatura do solo esteja entre 13 e 18°C e a umidade entre 40 e 60% da capacidade de campo (Coventry et al., 2002). Com isso, a aplicação feita na ausência de planta hospedeira estimula a germinação dos escleródios, levando-os à morte por falta de hospedeiros e reduzindo o inóculo do patógeno no solo (Domingos, 2015; Elshahawy et al., 2019).

Considerando o potencial da desinfestação anaeróbica do solo na redução de patógenos habitantes de solo e o efeito de indutores de germinação na redução da densidade de inóculo de *S. cepivora*, a hipótese deste trabalho é que a integração de ambas as práticas reduz o número de escleródios viáveis do patógeno em condições de campo. Com isso, caso tais práticas sejam conduzidas por alguns ciclos, é possível

minimizar o impacto do patógeno em culturas suscetíveis. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito supressor sobre *S. cepivora* da DAS com quatro fontes de carbono integrada com a aplicação de extrato de alho ou alicina como indutores de germinação em condições de campo.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Escolha do local para a montagem do experimento**

O estudo foi realizado na região do Alto Paranaíba – MG, uma das principais regiões produtoras de alho do Brasil, em uma área naturalmente infestada (Coordenadas: 19°15'39.92"S; 46°15'5.47"O; Altitude média: 1.145 m), com população relativamente homogênea no decorrer da topografia. A área pertence à Cooperativa Agropecuária do Alto Paranaíba (COOPADAP) em Rio Paranaíba - MG.

Antes de iniciar o experimento, subamostras de solo foram coletadas na profundidade de 0 a 20 centímetros, para compor uma amostra composta para a análise química e física do solo, que foi realizada pelo laboratório Unithal (Tabela 1).

### **2.2. Quantificação de inóculo de *Stromatinia cepivora***

A área experimental foi dividida em parcelas de 2,0 x 1,3 metros, dispostas em blocos. Em cada parcela, amostras de solo na profundidade de 0-20 centímetros foram coletadas com auxílio de um trado holandês no início do experimento para extração de escleródios. As amostras também foram coletadas após a retirada de plástico da DAS (aos 70 dias) e aos 40 dias após a primeira aplicação de indutores de germinação (aos 110 dias). O solo foi levado para laboratório para a realização da extração de escleródios no solo e avaliação da viabilidade. A extração e determinação da densidade de escleródios foi realizada de acordo com adaptação dos métodos de Papavizas (1972), Crowe; Hall (1980) e Vimard et al. (1986). As amostras de 100 cm<sup>3</sup> de solo foram dissolvidas em um litro de água e homogeneizadas em liquidificador em baixa rotação por um minuto, seguido da passagem em peneira de 20 mesh acoplada a uma de 60 mesh. Todo o material retido no liquidificador e na peneira de 20 mesh foi lavado novamente, até restar apenas resíduos maiores que os escleródios. O material retido na peneira de 20 mesh foi descartado e os resíduos da peneira de 60 mesh foram recolhidos com auxílio de pisseta com solução de sacarose 2,5M (preparada dissolvendo 855 gramas de sacarose em um litro de água) em béquer de

500 mL. Todo o material recolhido foi transferido do béquer para tubos Falcon de 50 mL e levados para centrífuga, onde foram centrifugados por oito minutos a 2000 rpm. O sobrenadante com os escleródios foi vertido na peneira de 60 mesh e lavado em água abundante para retirada total da sacarose, os resíduos decantados no fundo dos tubos foram descartados.

**Tabela 1.** Características físicas e químicas do solo da área experimental na profundidade de 0 a 20 centímetros.

<b>Característica analisada</b>	<b>Valor</b>	<b>Unidade</b>
Ph	5,80	(CaCl <sub>2</sub> )
pH	6,40	(H <sub>2</sub> O)
Hidrogênio + Alumínio (H+AL)	2,20	cmolc/dm <sup>3</sup>
Alumínio (Al)	0,00	cmolc/dm <sup>3</sup>
Cálcio (Ca)	3,60	cmolc/dm <sup>3</sup>
Magnésio (Mg)	0,90	cmolc/dm <sup>3</sup>
Potássio (K)	0,18	cmolc/dm <sup>3</sup>
Fósforo (P) [Mehlich]	33,00	mg/dm <sup>3</sup>
Fósforo (P) [Resina]	61,00	mg/dm <sup>3</sup>
Carbono (C)	25,00	g/dm <sup>3</sup>
Enxofre (S)	3,40	mg/dm <sup>3</sup>
Sódio (Na)	1,50	mg/dm <sup>3</sup>
Boro (B)	0,20	mg/dm <sup>3</sup>
Ferro (Fe)	11,50	mg/dm <sup>3</sup>
Manganês (Mn)	8,50	mg/dm <sup>3</sup>
Cobre (Cu)	5,00	mg/dm <sup>3</sup>
Zinco (Zn)	26,80	mg/dm <sup>3</sup>
Matéria Orgânica	4,30	%
Soma de Bases (SB)	4,68	cmolc/dm <sup>3</sup>
Capacidade Troca Catiônica (CTC)	6,88	cmolc/dm <sup>3</sup>
Saturação por Bases (V)	68,02	%

Análise realizada pelo Laboratório Unithal, Patos de Minas – MG.

Em seguida, o material retido na peneira foi recolhido em papel filtro e colocado para secar em temperatura ambiente por 24 horas. Após este período, o número total de escleródios de coloração preta sem brilho, geralmente esféricos e firmes (Figura 2) foi quantificado sob microscópio estereoscópico. Para determinação da viabilidade, os escleródios foram desinfestados superficialmente com etanol 70%

(v:v) por um minuto e em solução de hipoclorito de sódio 0,5% (v:v) por três minutos, seguido de imersão em água destilada esterilizada por duas vezes, para remoção do excesso de hipoclorito de sódio. Após, os escleródios foram colocados em placas de Petri contendo meio de cultura batata dextrose ágar (BDA), enriquecidos com extrato de alho aquoso a 20% na dose de 10 mL. L<sup>-1</sup> e antibiótico sulfato de estreptomicina na concentração de 500 mg. L<sup>-1</sup> e estas mantidas em BOD a 16 ± 2 °C por 15 dias. A partir do 3º dia, as placas foram avaliadas diariamente sob microscópio estereoscópico para observar o início da germinação dos escleródios, concluindo as avaliações aos 15 dias.



**Figura 2.** Escleródios de *Stromatinia cepivora* retirados do solo, analisados ao microscópio estereoscópico no aumento de 40x, após a secagem por 24 horas.

### **2.3. Fontes de carbono para uso na desinfestação anaeróbica do solo (DAS)**

Para este estudo, foram avaliadas duas fontes líquidas de carbono, sendo o etanol (5% v:v) e sacarose (açúcar cristal a 5% m:v, diluído em água), pois estas são fontes de fácil acesso e baratas no Brasil; e duas fontes sólidas, sendo palha de café e composto orgânico (derivado da compostagem de detritos bovinos e gramíneas), por serem duas fontes de fácil acesso na região, de custo relativamente barato e com uma baixa relação C:N, sendo de fácil decomposição (Tabela 2). Como cobertura do solo foi utilizado plástico preto (lona para silagem, dupla face mista C3-120.1).

**Tabela 2** – Análise química dos compostos utilizados como fonte de carbono na desinfestação anaeróbica do solo.

Elemento	Unidade	Palha de Café	Composto Orgânico
Nitrogênio (N)	%	1,82	2,05
Fósforo (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	%	0,41	1,36
Potássio (K <sub>2</sub> O)	%	2,00	0,40
Cálcio (Ca)	%	1,47	2,43
Magnésio (Mg)	%	0,12	0,65
Enxofre (S)	%	1,90	2,73
Ferro (Fe)	%	5,28	9,35
Manganês (Mn)	ppm	76,00	384,00
Cobre (Cu)	ppm	25,00	70,00
Zinco (Zn)	ppm	30,00	176,00
Boro (B)	ppm	190,00	238,00
Sódio (Na)	ppm	276,00	350,00
Matéria Orgânica	%	78,14	35,85
Cinzas	%	21,86	64,15
Umidade	%	15,74	38,27
pH	(CaCl <sub>2</sub> )	4,90	7,10
Relação C/N	-	24//1	10//1

Análise realizada pelo Laboratório Unithal, Patos de Minas – MG.

#### 2.4. Preparo do extrato de alho

Bulbilhos inteiros de alho cv. Ito foram lavados em água corrente e desinfestados em hipoclorito de sódio a 1,0%, por cinco minutos, para eliminar possíveis microrganismos presentes na superfície do vegetal. Em seguida, foram transferidos para um copo liquidificador contendo água destilada e triturados por 1 minuto, na proporção de 20% (m:v). O extrato foi mantido em repouso por três dias e, em seguida, o material foi filtrado em papel filtro. O extrato pronto foi mantido armazenado em geladeira até o uso.

#### 2.5. Avaliação química do extrato de alho e do produto à base de alicina

Os extratos foram submetidos à extração com metanol (MeOH), com 25 µL/mL de Adonitol Purex como padrão interno. As amostras foram agitadas em vórtex por 5 segundos e mantidas em repouso por 1 min. Posteriormente foram retirados 500 µL de suas porções médias e colocados em microtubos para secagem no liofilizador por 48 h. As amostras secas foram metoximadas em 50 µL de hidrocloreto de metoxiamina diluído em piridina (20 mg/mL) a 37 °C por 2 h e trimetilsililadas pela

adição de 50 µL de BSFTA [Bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide] a 37 °C por 30 min. As alíquotas derivatizadas foram transferidas para vials de 2 mL com inserts redutores de volume de 200 µL para realização da análise cromatográfica.

A análise foi realizada por cromatografia gasosa com espectrômetro de massas acoplado (GCMS-QP2010, Shimadzu, Kyoto, Japão), utilizando a coluna capilar DB-5MS (30 m × 250 µm diâmetro interno). A temperatura de injeção de amostras utilizada foi 300 °C. A separação cromatográfica foi realizada com a temperatura inicial da coluna de 80 °C, que foi mantida por 2 minutos, aumentada em taxa de 5 °C/min até atingir 315 °C, temperatura final que foi mantida por 5 minutos, com fluxo constante de gás hélio de 1,0 mL/min durante toda a corrida. O volume de injeção foi de 1 µL com split de 10:1. Foi feita a varredura do espectro de massas no intervalo de 50 a 650 m/z em modo de scan completo, com 5 scans por segundo. Utilizou-se 5 min de corte de solvente, considerando o tempo de retenção da piridina utilizada na etapa de derivatização. As temperaturas de interface e da fonte de íons utilizadas foi de 250 °C. A voltagem do detector foi de 1,2 kV e o modelo de impacto de elétrons (EI) foi selecionado para ionização dos metabólitos em 70 eV. Um padrão de alcanos (C9-C25) foi utilizado como controle de qualidade e cálculo dos índices de retenção.

## **2.6. Efeito da DAS sobre escleródios de *Stromatinia cepivora***

Após a divisão das parcelas em campo, as fontes sólidas foram aplicadas na dose de 9.000 kg.ha<sup>-1</sup> e incorporadas à 20 cm, seguido pela irrigação da área via pivô central com uma lâmina de água de 10 mm. Posteriormente a irrigação, foi suplementado com 120 litros de água por parcela para atingir a saturação do solo e, por fim, foram aplicados os tratamentos líquidos utilizando um volume de calda de 5 litros nas respectivas parcelas (250 gramas de sacarose e 250 mL de etanol) e vedado o solo com lona.

As parcelas permaneceram vedadas por 10 semanas. Após esse período, o solo foi descoberto e foram retiradas novamente amostras de solo para determinação da população do patógeno conforme descrito anteriormente, a fim de avaliar o efeito da DAS durante o período utilizado.

## **2.7. Efeito da aplicação de compostos derivados do alho sobre escleródios de *Stromatinia cepivora***

O extrato de alho foi aplicado via drench, com ajuda de regadores de jardim, com a dose adaptada de acordo com a recomendação de Villalta (2012). Foram feitas duas aplicações do extrato na dose de 200 litros por hectare, diluído em aproximadamente 4 mm de água para facilitar a percolação do produto no perfil do solo, sendo aplicado cerca de 52 mL do extrato por parcela. O produto à base de alicina foi aplicado do mesmo modo, mas na dose de 100 L/ha. A primeira aplicação foi feita após o descanso do solo ao finalizar a DAS, aos sete dias após descobrir o solo. A segunda aplicação foi feita aos 15 dias após a primeira.

O solo foi irrigado constantemente para manter as condições ideais para o desenvolvimento do fungo, simulando as condições que haveria na presença da cultura do alho. Passados 40 dias após a primeira aplicação, amostras de solo foram retiradas para a extração dos escleródios do solo. A viabilidade dos escleródios foi avaliada conforme descrito no item 2.2. Durante todo o experimento, a temperatura e a umidade do solo foram mensuradas com a utilização de uma estação meteorológica (iCrop – Gestão de Irrigação).

## **2.8. Delineamento experimental e análise estatística**

O experimento foi conduzido duas vezes simultaneamente, no delineamento experimental em blocos casualizados, com quinze tratamentos e quatro repetições, sendo os tratamentos: (1) aplicação de alicina (100 L/ha); (2) aplicação de extrato aquoso de alho (200 L/ha); (3) aplicação de sacarose (5% m:v) e cobertura do solo; (4) aplicação de sacarose (5% m:v), cobertura do solo e posterior aplicação de alicina (100 L/ha); (5) aplicação de sacarose (5% m:v), cobertura do solo e posterior aplicação de extrato aquoso de alho (200 L/ha); (6) aplicação de etanol (5% v:v) e cobertura do solo; (7) aplicação de etanol (5% v:v), cobertura do solo e posterior aplicação de alicina (100 L/ha); (8) aplicação de etanol (5% m:v), cobertura do solo e posterior aplicação de extrato aquoso de alho (200 L/ha); (9) aplicação de palha de café (9 t/ha) e cobertura do solo; (10) aplicação de palha de café (9 t/ha), cobertura do solo e posterior aplicação de alicina (100 L/ha); (11) aplicação de palha de café (9 t/ha), cobertura do solo e posterior aplicação de extrato aquoso de alho (200 L/ha); (12) aplicação de composto orgânico (9 t/ha) e cobertura do solo; (13) aplicação de composto orgânico (9 t/ha), cobertura do solo e posterior aplicação de alicina (100

L/ha); (14) aplicação de composto orgânico (9 t/ha), cobertura do solo e posterior aplicação de extrato aquoso de alho (200 L/ha); (15) solo em pousio (testemunha).

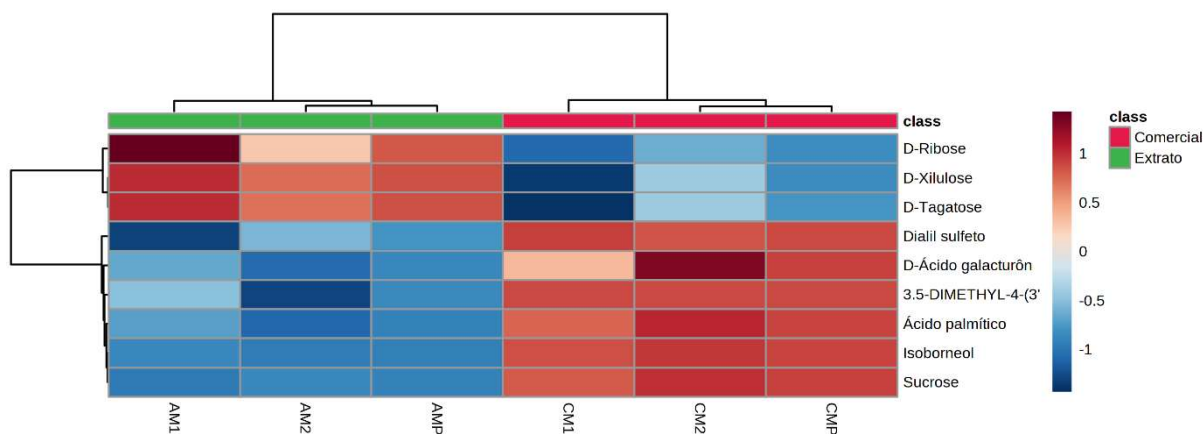
Os dados foram submetidos à análise descritiva por meio de gráficos do tipo Boxplot, com uso do software R. Os resultados de cada tratamento foram comparados de acordo com a média aritmética simples de cada tratamento, expressos em porcentagem.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Análise química dos metabólitos do extrato aquoso de alho e da alicina

O estudo metabolômico detectou nove metabólitos com diferença estatística significativa de suas intensidades entre os dois tratamentos colocar aqui os 2 tratamentos ( $p < 0,05$  obtido a partir do Teste T de Student). Dentre esses metabólitos identificados foram obtidos grupos de carboidratos como a Sacarose ( $p = 4,2346E-6$ ; FC = 0,16754); a D-Tagatose ( $p = 0,0052502$ ; FC = 5,7538); D-Ácido Galacturônico ( $p = 0,0034932$ ; FC = 0,20913) e a D-Xilulose ( $p = 0,0050004$ ; FC = 1,6697). O ácido graxo com diferença significativa encontrado foi o Ácido palmítico ( $p = 1,3343E-4$ ; FC = 0,25653). Também foi encontrado Isoborneol ( $p = 2,7461E-4$ ; FC = 0,11759); pertencente ao grupo dos álcoois. Outros compostos como o Fosfato ( $p = 3,0501E-5$ ; FC = 0,6675) e o Octano ( $p = 1,3414E-4$ ; FC = 3,9512) também foram identificados. O composto organossulfurado que apresentou diferença significativa foi o Dialil-Sulfeto ( $p = 0,0031359$ ; FC = 0,14438).

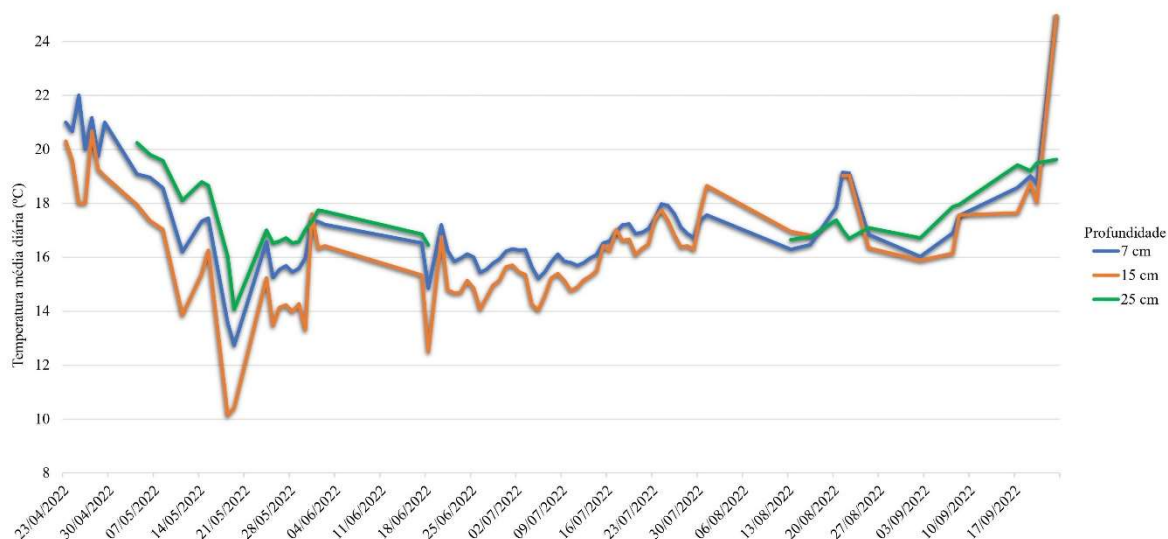
O *heatmap* construído com base no agrupamento hierárquico dos nove metabólitos que apresentam diferença estatística significativa indicou agrupamento dos dois tratamentos, sendo seis com maior abundância no produto à base de alicina e três com maior abundância no extrato aquoso de alho (Figura 3).



**Figura 3** – *Heatmap* de nove metabólitos majoritários em extrato aquoso de alho a 20% (m:v), à direita, e um produto à base de alicina, à esquerda. A intensidade da cor corresponde com a concentração dos compostos, sendo azul quanto a menor e a vermelha a maior concentração.

### 3.2. Experimentos em campo

As condições ambientais foram favoráveis para o desenvolvimento da podridão-branca, com temperatura de 13-18 °C e umidade de 40-60% da capacidade de campo (Figuras 4 e 5).



**Figura 4.** Temperatura média diária do solo em diferentes profundidades durante o período do experimento na área.



**Figura 5.** Umidade média diária do solo em diferentes profundidades durante o período do experimento na área.

Os números de escleródios totais, chochos (com hifas aparentes ou deformados e/ou estourados, de acordo com Domingos et al., 2015) e viáveis não foram reduzidos em parcelas não tratadas (testemunha) em ambos os experimentos (Figura 6A). O número de escleródios totais variou entre 7 e 15 com média de 10,75 no experimento 1 e entre 4 e 12 com média de 7,25 no experimento 2. Em média, havia 96,9 e 71,4% de escleródios viáveis na testemunha no experimento 1 e 2, respectivamente (Figura 6A).

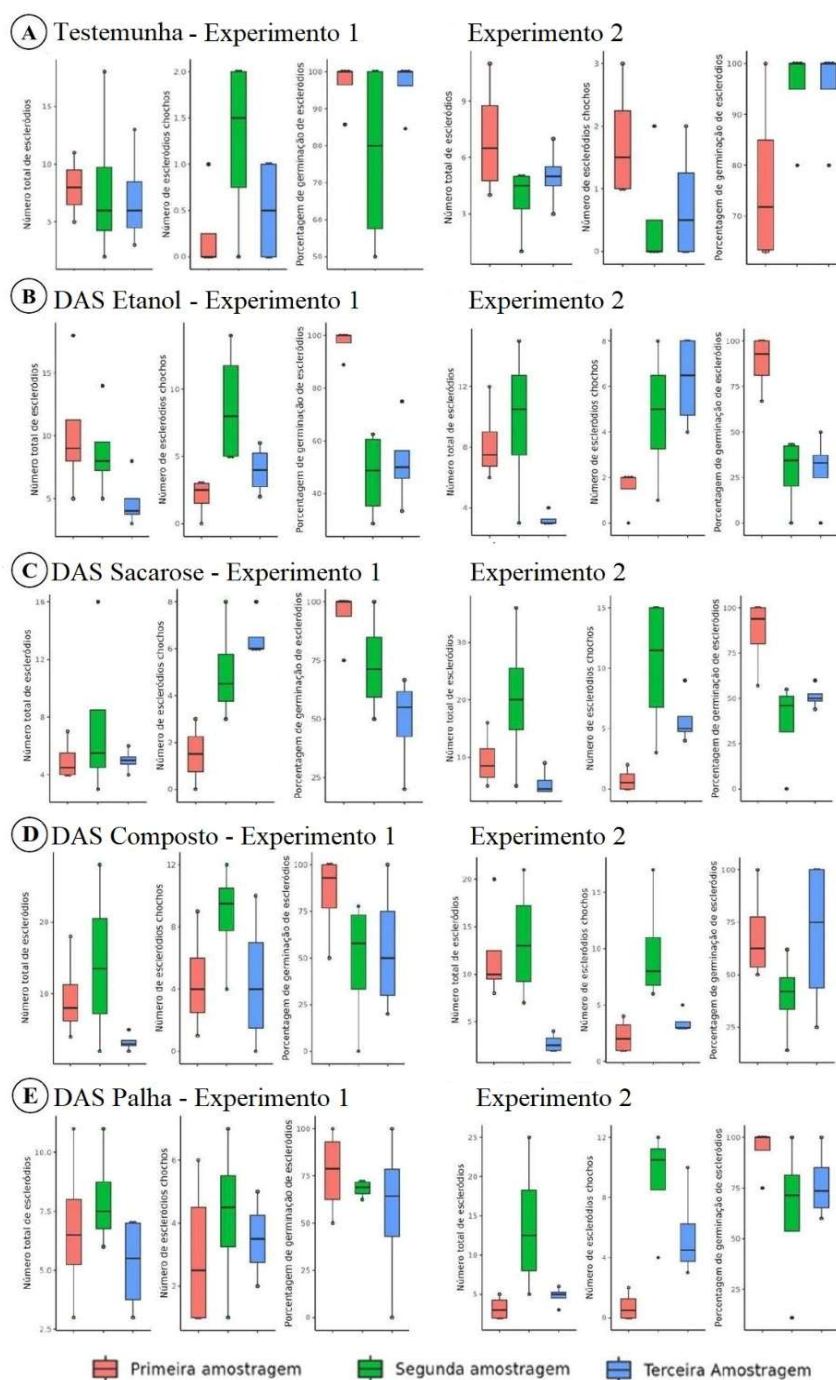
Para análise do efeito apenas da desinfestação anaeróbica do solo (DAS) sobre *S. cepivora*, foram considerados os dados da segunda amostragem, feita após a retirada do plástico ao final de 10 semanas, em comparação com o da primeira amostragem, feita no início do experimento, antes da cobertura do solo (Figura 6). Entre a segunda e terceira amostragem não houve interferência experimental em parcelas submetidas apenas à DAS. Assim, foi observado que a DAS não reduziu o número de escleródios totais em ambos os experimentos, independentemente da fonte de carbono (Figura 6B-E). No entanto, o número de escleródios chochos aumentou em 337,5% no primeiro experimento em parcelas submetidas à DAS com etanol e em 1266,333,1133% após DAS com sacarose, composto orgânico e palha de café no experimento 2, respectivamente (Figura 6B-E). Por fim, a DAS com etanol reduziu o número de escleródios viáveis em 56,1 e 63,3% nos experimentos 1 e 2

(Figura 6B), a DAS com sacarose reduziu em 48,8% a densidade de escleródios viáveis de *S. cepivora* no segundo experimento (Figura 6C).

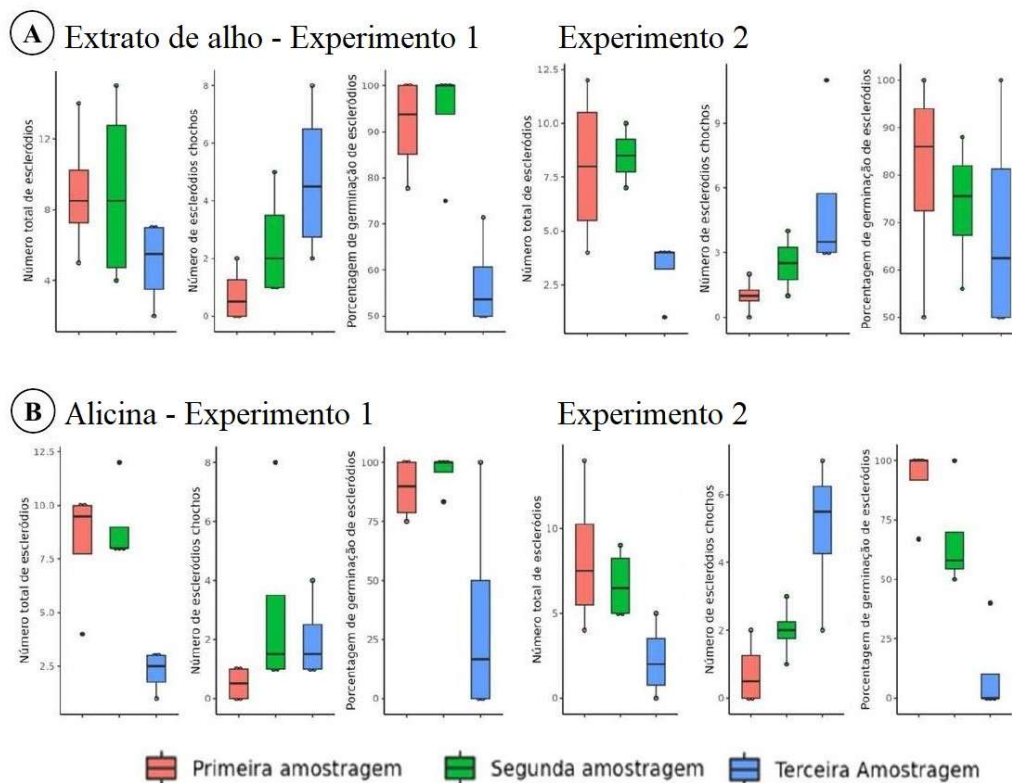
A aplicação apenas dos indutores de germinação nas parcelas impactou de forma distinta a população de escleródios de *S. cepivora* em ambos os experimentos, considerando os propágulos extraídos na segunda e terceira amostragens (Figura 7). Parcelas tratadas com extrato de alho e alicina não tiveram aumento no número de escleródios chochos em ambos os experimentos (Figura 7). No entanto, o número de escleródios totais foi reduzido em 61,8% (Figura 7A) após a aplicação de extrato de alho no segundo experimento e 75,0% quando alicina foi usada no primeiro experimento (Figura 7B). O número de escleródios viáveis de *S. cepivora* foi reduzido em 38,3% após aplicação do extrato de alho (Figura 7A) no primeiro experimento e em 64,7% quando o solo recebeu a aplicação de alicina no segundo experimento (Figura 7B).

Na combinação entre DAS e aplicação de indutores de germinação de escleródios foram considerados os dados de propágulos extraídos do solo no início (primeira amostragem) e final do experimento (terceira amostragem) (Figuras 8 e 9). A DAS com etanol ou sacarose, seguida da aplicação de extrato de alho não reduziu o número de escleródios totais em ambos os experimentos (Figuras 8 e 9). Na integração de DAS usando etanol como fonte de carbono e extrato de alho como indutor de germinação, houve aumento de 675 e 485% no número de escleródios chochos e redução em média de 50,3 a 63% no número de escleródios viáveis (Figura 8A). Em parcelas submetidas à DAS + alicina, o número de escleródios totais foi reduzido em 76,6% no primeiro experimento, houve um aumento de 145,5 e 425,0% no número de escleródios chochos, e a população de escleródios viáveis foi reduzida entre 59,6 (experimento 2) e 90,1% (experimento 1) (Figura 8).

Em parcelas submetidas à DAS com sacarose e aplicação de extrato de alho, o número de escleródios chochos aumentou entre 81,8 e 550,0% e houve redução de 72,4% no número de escleródios viáveis no segundo experimento (Figura 8C). Quando a DAS foi feita com sacarose e o indutor foi a alicina o número de escleródios totais foi reduzido em aproximadamente 80% em ambos os experimentos e a população de escleródios viáveis sofreu decréscimo médio de 63,9 (experimento 2) e 91,3% (experimento 1) (Figura 8D).



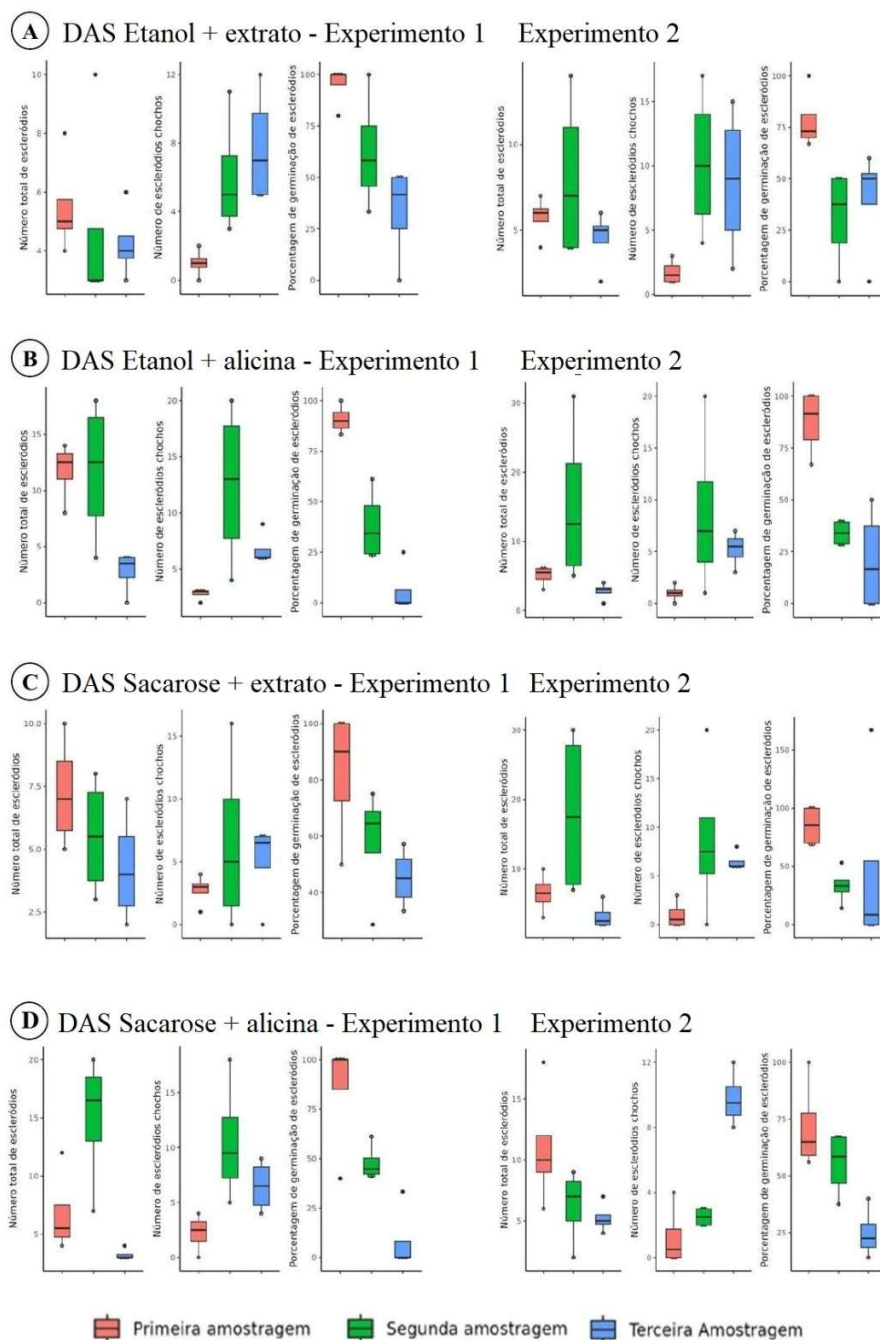
**Figura 6** – Efeito da desinfestação anaeróbica do solo (DAS) por 10 semanas com etanol (B), sacarose (C), composto orgânico (D) e palha de café (E) sobre a população de escleródios de *Stromatinia cepivora* em dois experimentos realizados em área naturalmente infestada em Rio Paranaíba-MG. Parcelas não tratadas foram consideradas como testemunha (A). Primeira amostragem = início do experimento, antes da DAS. Dia 0. Segunda amostragem = sete dias após a retirada da cobertura do solo da DAS. 1ª aplicação de indutores de germinação, quando necessário. Dia 77. Terceira amostragem = Término do experimento. 40 dias após a primeira aplicação de indutores de germinação. Dia 117.



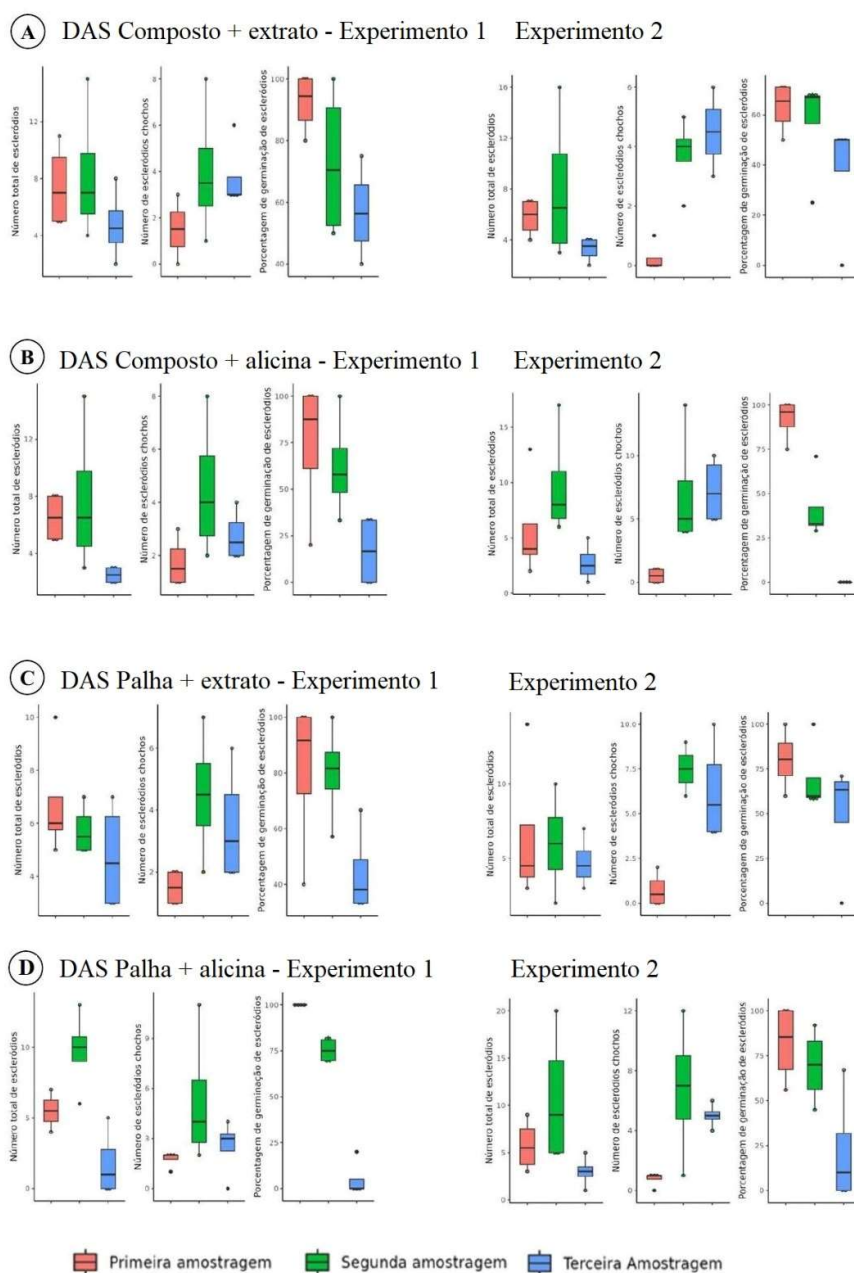
**Figura 7** – Efeito aplicação de indutores de germinação com extrato de alho (A) e produto a base de alicina (B) sobre a população de escleródios de *Stromatinia cepivora* em dois experimentos realizados em área naturalmente infestada em Rio Paranaíba-MG. Primeira amostragem = início do experimento, antes da DAS. Dia 0. Segunda amostragem = sete dias após a retirada da cobertura do solo da DAS. 1ª aplicação de indutores de germinação, quando necessário. Dia 77. Terceira amostragem = Término do experimento. 40 dias após a primeira aplicação de indutores de germinação. Dia 117.

A DAS usando composto orgânico integrada com a aplicação de extrato de alho não reduziu o número de escleródios totais de *S. cepivora*, mas aumentou em 1700% o número de escleródios chochos no segundo experimento e reduziu em 38% a população de escleródios viáveis apenas no primeiro experimento (Figura 9A). Quando alicina foi aplicada após DAS com composto orgânico, houve redução de 61,5% no primeiro experimento, aumento de 1350% no número de escleródios chochos no segundo experimento e redução de 100% na população de escleródios viáveis no segundo experimento (Figura 9B). A combinação entre DAS com palha de café e extrato de alho não reduziu o número de escleródios totais, nem viáveis, com apenas aumento significativo de 733,3% no número de escleródios chochos no

segundo experimento (Figura 9C). Com a mudança apenas do indutor de germinação para alicina, não houve redução no número de escleródios totais, mas foi observado aumento de 42,9 e 566,7% no número de escleródios chochos e redução de 85,7% na densidade de propágulos viáveis de *S. cepivora* no primeiro experimento (Figura 9D).



**Figura 8** - Efeito da desinfestação anaeróbica do solo (DAS) por 10 semanas associada a indutores de germinação com etanol + extrato de alho (A), etanol + alicina (B), sacarose + extrato de alho (C), sacarose + alicina (D) sobre a população de escleródios de *Stromatinia cepivora* em dois experimentos realizados em área naturalmente infestada em Rio Paranaíba-MG. Primeira amostragem = início do experimento, antes da DAS. Dia 0. Segunda amostragem = sete dias após a retirada da cobertura do solo da DAS. 1ª aplicação de indutores de germinação, quando necessário. Dia 77. Terceira amostragem = Término do experimento. 40 dias após a primeira aplicação de indutores de germinação. Dia 117.



**Figura 9** – Efeito da desinfestação anaeróbica do solo (DAS) por 10 semanas associada a indutores de germinação com composto orgânico + extrato de alho (A), composto orgânico + alicina (B), palha de café + extrato de alho (C), palha de café + alicina (D) sobre a população de escleródios de *Stromatinia cepivora* em dois experimentos realizados em área naturalmente infestada em Rio Paranaíba-MG. Primeira amostragem = início do experimento, antes da DAS. Dia 0. Segunda amostragem = sete dias após a retirada da cobertura do solo da DAS. 1ª aplicação de indutores de germinação, quando necessário. Dia 77. Terceira amostragem = Término do experimento. 40 dias após a primeira aplicação de indutores de germinação. Dia 117.

#### 4. DISCUSSÃO

Este trabalho é o primeiro no mundo que demonstrou a eficiência da DAS no controle de *S. cepivora* e a integração dessa técnica com a aplicação integrada de indutores de germinação de escleródios em condições de campo. A longevidade dos escleródios de *S. cepivora* na ausência de plantas hospedeiras é um dos principais fatores que limitam o manejo eficiente desse patógeno no campo. Em razão disso, várias práticas de controle devem ser adotadas para reduzir a densidade de inóculo do fungo no solo, já que nenhum método sozinho tem apresentado eficiência no controle deste patógeno (Pontin et al., 2015).

A desinfestação anaeróbica do solo pode controlar vários patógenos habitantes de solo devido a múltiplos mecanismos de ação, envolvendo a interação de uma série de fatores como a falta do oxigênio, o antagonismo de microrganismos anaeróbicos e ao acúmulo de produtos tóxicos resultantes da decomposição anaeróbica, como ácidos orgânicos; sulfuretos de metila;  $\text{NH}_3$ ;  $\text{H}_2\text{S}$ ;  $\text{CH}_4$  e  $\text{N}_2\text{O}$  (Lopes et al., 2022).

Fungos formadores de escleródios a exemplo de *Rhizoctonia solani*, *Athelia rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum* podem ser manejados com o uso da DAS (Mazzola et al., 2020; Shrestha et al., 2018; Sanabria-Velazquez et al., 2020). No entanto, nenhum trabalho em campo havia sido feito para avaliar o efeito da DAS contra *S. cepivora* no mundo. Considerando que a eficiência da DAS varia em função do tipo de fonte de carbono usada (Lopes et al., 2022), neste trabalho foram avaliados duas fontes de carbono simples líquidas e diluídas em água (etanol e sacarose) e duas fontes de carbono complexas e sólidas (composto orgânico e palha de café). De forma geral, a DAS usando etanol foi a mais eficiente, se comparado com as demais fontes de carbono, resultando em aproximadamente 60% de redução na densidade de escleródios viáveis no solo. Diversos trabalhos já demonstraram a maior eficiência da fonte líquida na DAS e, dentre elas, o destaque para o etanol (Shrestha et al., 2016), que além penetrar facilmente nos poros do solo e ser uma fonte livre de nitrogênio facilitando sua aplicação, produz muitos voláteis tóxicos durante a DAS (Hewavitharana et al., 2014).

O uso de indutores de germinação reduz a densidade de escleródios de *S. cepivora* por favorecer que os escleródios germinem na ausência do hospedeiro. Como o patógeno não possui boa capacidade de sobrevivência na forma de micélio, fica mais exposto ao ataque de antagonistas, à ação de compostos químicos e às condições ambientais (Domingos et al., 2015). A eficiência do controle pode variar em

função da dose aplicada, temperatura do solo, frequência de aplicação e a concentração de compostos estimulantes na solução (Crowe et al., 1980; Elshahawy et al., 2019). De forma geral, a aplicação de extrato de alho ou alicina reduziu a população de escleródios viáveis no solo, embora sem a mesma consistência em ambos os experimentos, com maior magnitude de redução com o uso de alicina. Conforme demonstrado após análise química (Figura 5), a alicina possuía maior concentração de dialil-sulfeto que o extrato de alho, o que pode ter influenciado na diferença com o extrato de alho já que os compostos organossulfurados, como o dialil sulfeto e o dialil dissulfeto, são os principais responsáveis pela resposta dos escleródios de *S. cepivora* por serem compostos presentes naturalmente em *Allium* spp. (Davis et al., 2007; Domingos et al., 2015; Elshahawy et al., 2019). Assim, é possível que o uso de extrato aquoso de alho em maiores concentrações obtenha um melhor efeito na indução da germinação de escleródios, ou com diferentes solventes como o extrato etanólico (Domingos et al., 2015).

Do ponto de vista do manejo da podridão branca, a densidade inicial de escleródios no solo é importante, pois com poucos escleródios viáveis a doença pode causar perdas econômicas (Crowe et al., 1980; Elshahawy et al., 2019). Por essa razão, avaliamos a densidade total de propágulos, de chochos (que podem ter germinado ou sofrido algum processo de degradação) e, o mais importante, a de viáveis, que causarão impacto nas culturas hospedeiras. De forma geral, houve considerável variação dos tratamentos na redução do número de escleródios totais e no aumento de escleródios chochos nos dois experimentos. Todavia, foi notável que alguns tratamentos foram consistentes na redução de escleródios viáveis, principalmente quando a DAS foi combinada com a aplicação de indutores de germinação.

A desinfestação anaeróbica com etanol ou sacarose, seguido da aplicação de alicina foi capaz de reduzir entre 60 e 90% a população de escleródios viáveis de *S. cepivora*. No caso da DAS com etanol, embora a prática isoladamente tenha causado redução média de 60% no número de escleródios viáveis, a integração com alicina foi ainda mais eficiente na redução de inóculo viável do patógeno em campo (média de 74,85% de decréscimo). Ainda mais notável foi o efeito sinérgico da DAS com sacarose e aplicação de alicina. Se com o uso isolado da DAS com sacarose o efeito supressor na população de escleródios viáveis foi observado apenas em um experimento (aproximadamente 49%), quando combinado com aplicação de alicina

foi observada a redução média de 77,6% na densidade de escleródios viáveis em ambos os experimentos. Assim a combinação destas duas técnicas pode viabilizar a exploração de áreas infestadas com *S. cepivora* ao utilizar a DAS com etanol ou sacarose (em área total ou em reboleiras) no verão e no inverno realizar a aplicação de alicina, com a possibilidade de haver uma cultura instalada.

Outro efeito da DAS foi observado em campo, apesar de não ser o foco do estudo. A incidência de plantas daninhas foi drasticamente diminuída pelo método (Figura 10); porém, não foram feitas avaliações para estimar tal efeito. De acordo com uma metanálise publicada em 2016, diversos trabalhos já demonstraram a eficiência da técnica para o controle de plantas daninhas (Shrestha et al., 2016).

Outros trabalhos já estão sendo conduzidos em campo para reforçar os resultados positivos obtidos da DAS e da indução de germinação sob escleródios de *S. cepivora*, como a repetição do experimento na mesma área por anos subsequentes e a integração com outras técnicas de manejo.

## 5. CONCLUSÃO

A desinfestação anaeróbica do solo (DAS) por dez semanas reduz a densidade de escleródios viáveis de *S. cepivora* utilizando etanol e sacarose como fontes de carbono, sendo os tratamentos mais eficientes.

A aplicação somente de extrato de alho (20%, m/v) reduz o número de escleródios totais e de viáveis, já a alicina reduz em maior intensidade.

Na integração da DAS com a aplicação de indutores, a combinação de etanol com extrato de alho aumenta o número de escleródios chochos e reduz o número de viáveis. A combinação de DAS etanol + aplicação de alicina reduz o número de escleródios totais, a população de viáveis e aumenta o número de chochos.

A combinação de DAS com sacarose e indução de germinação com extrato de alho aumenta o número de escleródios chochos e reduz o número de viáveis. Quando a alicina for usada, o número de escleródios totais reduz e a população de viáveis decresce.

A combinação de DAS usando composto orgânico com aplicação de extrato de alho aumenta o número de escleródios chochos e reduz a densidade de viáveis. Com alicina, ocorre redução na população total de escleródios, aumento na quantidade de escleródios chochos e redução de escleródios viáveis somente no segundo experimento.

A DAS usando a palha de café combinada com extrato de alho aumenta somente o número de chochos, já com alicina o incremento no número de chochos é superior, e a redução da densidade de propágulos viáveis de *S. cepivora* relevante.

Logo, a DAS com etanol ou sacarose com posterior aplicação de alicina reduz de forma mais consistente a população de escleródios de *S. cepivora*. Essas fontes de carbono são de fácil acesso, manuseio e relativamente baratas, podendo ser uma excelente opção para os produtores de culturas de *Allium* spp. no manejo de *S. cepivora*.



**Figura 10** – Visão geral das parcelas após 10 semanas da desinfestação anaeróbica do solo (DAS) e 40 dias da aplicação de compostos derivados do alho. A e B – Testemunhas dos experimentos 1 e 2; C e D – Tratamento com DAS usando etanol dos experimentos 1 e 2; E e F – Tratamento com DAS usando sacarose dos experimentos 1 e 2.

## REFERÊNCIAS

AGROFIT. **Sistemas de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <[https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acessado em 23 de maio de 2023.

BUENO, C.J.; AMBRÓSIO, M.M. DE Q.; SOUZA, N.L. Produção e avaliação da sobrevivência de estruturas de resistência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Summa Phytopathologica**, 33: 47 - 55. 2007.

BLOK, W.J.; LAMERS, J.G.; TERMORSHUIZEN, A.J.; BOLLEN, G.J. Control of soilborne plant pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by tarping. **Phytopathology**, 90: 253 - 259. 2000.

CANEDO, É. J. Potencial de redução da viabilidade de *Meloidogyne javanica* e *Stromatinia cepivora* por meio da desinfestação anaeróbica do solo. 52 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Produção Vegetal) - **Universidade Federal de Viçosa**, Rio Paranaíba. 2019.

CHEN, Y., ZHANG, H., TIAN, X. Research progress on extraction of garlic and its active components and application in agriculture. **Chinese Journal of Agricultural Science**, 46(17): 3599 - 3611. 2013.

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

COLEY-SMITH J. R., PARFITT D. Some effects of diallyl disulphide on sclerotia of *Sclerotium cepivorum*: possible novel control method for white rot disease of onions. **Pesticide Science** 17: 587 - 594. 1986.

COLEY-SMITH, J.R., PARFITT, D., TAYLOR, I.M., REESE, R.A. Studies of dormancy in sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. **Plant Pathology** 36: 594 - 599. 1987.

CONAB, **Análise Mensal** – Alho: Setembro de 2021. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-alho/item/download>. Acessado em 20 de abril de 2023.

CONAB, **Série Histórica** – Custos – Alho – 2015 a 2021. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/custos-de-producao/planilhas-de-custo-de-producao/itemlist/category/789-alho>. Acessado em 20 de abril de 2023.

COVENTRY, E., NOBLE, R., MEAD, A., WHIPPS, J.M. Control of Allium White Rot (*Sclerotium cepivorum*) with composted onion waste. **Soil Biology Biochemistry** 34: 1037 – 1045. 2002.

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

CROWE F. J. White rot. In: Schwartz HF, Mohan SK (Ed.) Compendium of onion and garlic diseases. **The American Phytopathological Society**, St. Paul, USA. p. 22-26. 2008.

DOMINGOS, L. B.; BONTEMPO, A.; LOPES, E. Podridão-branca do alho e da cebola. **Avanços Tecnológicos Aplicados à Pesquisa na Produção Vegetal**. Disponível em: <https://docplayer.com.br/66378034-Podridao-branca-do-alho-e-da-cebola.html>. Acessado em 22 de janeiro de 2023. 2015.

ELSHAHAWY, I., MORSY, A., ABD-EL-KAREEM, F., & SAIED, N. Reduction of *Stromatinia cepivora* inocula and control of white rot disease in onion and garlic crops by repeated soil applications with sclerotial germination stimulants. **Heliyon**, 5(1), E01168. 2019.

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

GOUD, J. K. C.; TERMORSHUIZEN, A. J.; BLOK, W. J.; VAN BRUGGEN, A. H. C. Long-term effect of biological soil disinfestation on *Verticillium* wilt. **Plant Disease**, 88: 688-694. 2004.

HEWAVITHARANA, S.S., RUDDLELL, D. & MAZZOLA, M. Carbon source-dependent antifungal and nematicidal volatiles derived during anaerobic soil disinfestation. **Eur Journal Plant Pathology** 140: 39 – 52. 2014.

IBGE. **Horticultura**: número de estabelecimentos agropecuários e quantidade produzida por produtos da horticultura. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6619#resultado>. Acessado em 02 de maio de 2023. 2017.

KATAN, J.; GREENBERGER, A.; ALON, H.; GRINSTEIN, A. Solar heating by polyethylene mulching for the control of diseases caused by soil-borne pathogens. **Phytopathology**, 66: 683 - 688. 1976.

LOPES, E., CANEDO, E., GOMES, V., VIEIRA, B., PARREIRA, D., & NEVES, W. Anaerobic soil disinfestation for the management of soilborne pathogens: A review. **Applied Soil Ecology: A Section of Agriculture, Ecosystems & Environment**, 174, 104408. 2022.

LOURENÇO JR, V. Podridão branca em alho e cebola: doença destrutiva, mas de pouca importância para os fitopatologistas. **Embrapa Hortaliças**, p. 27-29. 2017.

LOURENÇO JR, V.; RESENDE, F. V.; OLIVEIRA, V. R. DE; MELO, R. A. DE C.; MOITA, A. W.; LOPES, E. A. Efeito de agentes de biocontrole, extrato de planta e fungicidas no progresso da podridão branca em alho. Brasília, DF; 20 p.: il. color. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Hortaliças**, ISSN 1677-2229; 168. 2018.

LOURENÇO JR, V.; VIEIRA, B. S.; LOPES, E. A.; VILLALTA, O. N. Etiology, epidemiology, and management of white rot on onion and garlic: current knowledge and future directions for Brazil. **Científica**, 46: 241-256. 2018.

MAZZOLA, M., GRAHAM, D., WANG, L., LEISSO, R., HEWAVITHARANA, S.S. Application sequence modulates microbiome composition, plant growth and apple replant disease control efficiency upon integration of anaerobic soil disinfestation and mustard seed meal amendment. **Crop Protection** 132, 105125. 2020

MOMMA, N.; KOBARA, Y.; UEMATSU, S.; KITA, N.; SHINMURA, A. Development of biological soil disinfestations in Japan. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 97: 3801-3809. 2013.

MORAIS, JÚNIOR. **Revista campo e negócio**. Alho brasileiro sofre concorrência desleal. Disponível em: <https://anapa.com.br/revista-campo-e-negocio-alho-brasileiro-sofre-concorrencia-desleal/#>. Acessado em 08 de março de 2023. 2018.

PONTIN, M., BOTTINI, R., BURBA, J., & PICCOLI, P. *Allium sativum* produces terpenes with fungistatic properties in response to infection with *Sclerotium cepivorum*. **Phytochemistry** (Oxford), 115: 152-160. 2015.

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, AT: **R Foundation for Statistical Computing**. Acesso em Junho, 2023 em <https://www.R-project.org>. 2023.

ROSSKOPF, E. N.; BURELLE, N.; HONG, J.; BUTLER, D.M.; NOLING, J.W.; HE, Z.; BOOKER, B.; SANCES, S. Comparison of anaerobic soil disinfestation and

drip-applied organic acids for raised-bed specialty crop production in Florida. **Acta Horticulturae**, 1044: 221–228. 2014.

RUNIA, W.T.; THODEN, T.C.; MOLENDIJK, L.P.G.; VAN DEN BERG, W.; TERMORSHUIZEN, A.J.; STREMINSKA, M.A.; VAN DER WURFF, A.W.G.; FEIL, H.; MEINTS, H. Unravelling the mechanism of pathogen inactivation during anaerobic soil disinfestation. **Acta Horticulturae**, 1044: 177 – 193. 2014.

SANABRIA-VELAZQUEZ, A.D., TESTEN, A.L., KHADKA, R.B., LIU, Z., XU, F., MILLER, S.A. Anaerobic soil disinfestation reduces viability of *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor sclerotia* and root-knot nematodes in muck soils. **Phytopathology** 110: 795 – 804. 2020.

SHENNAN, C.; MURAMOTO, J.; LAMERS, J.; MAZZOLA, M.; ROSSKOPF, E.N.; KOKALIS-BURELLE, N.; MOMMA, N.; BUTLER, D.M.; KOBARA, Y. Anaerobic soil disinfestation for soil borne disease control in strawberry and vegetable systems: current knowledge and future directions. **Acta Horticulturae**, 1044: 165 – 175. 2014.

SHINMURA, A. Causal agent and control of root rot of welsh onion. **PSJ Soilborne Disease Workshop Report**, 20: 133-143. 2000.

SHRESTHA, U.; AUGÉ, R.M.; BUTLER, D.M. A meta-analysis of the impact of anaerobic soil disinfestation on pest suppression and yield of horticultural crops. **Frontiers in Plant Science**, 7: 1254, Article 1254. 2016.

SHRESTHA, U.; DEE, M.E.; OWNLEY, B.H.; BUTLER, D.M. Anaerobic soil disinfestation reduces germination and affects colonization of *Sclerotium rolfsii* sclerotia. **Phytopathology**, 108: 342-351. 2018.

SINGH, R. et al. Garlic extract: a promising alternative to conventional pesticides in agriculture. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, 54: 828 - 836. 2019.

STRAUSS, S.L.; KLUEPFEL, D.A. Anaerobic soil disinfestation: A chemical-independent approach to pre-plant control of plant pathogens. **Journal of Integrative Agriculture**, 14: 2309 - 2318. 2015.

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