



LETÍCIA GABRIELA FERREIRA DE ALMEIDA

**POTENCIAL DE UM FUNGO CERCOSPORÓIDE NO CONTROLE DA
PODRIDÃO BRANCA DO ALHO**

LAVRAS – MG

2021

LETÍCIA GABRIELA FERREIRA DE ALMEIDA

**POTENCIAL DE UM FUNGO CERCOSPORÓIDE NO CONTROLE DA
PODRIDÃO BRANCA DO ALHO**

Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza Orientador

Orientador

Dr. Valter Cruz Magalhães

Coorientador

LAVRAS – MG

2021

LETÍCIA GABRIELA FERREIRA DE ALMEIDA

**POTENCIAL DE UM FUNGO CERCOSPORÓIDE NO CONTROLE DA
PODRIDÃO BRANCA DO ALHO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Universidade Federal de Lavras, como parte
das exigências do Curso de Agronomia, para a
obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza Orientador

Orientador

Dr. Valter Cruz Magalhães

Coorientador

LAVRAS – MG

2021

LETÍCIA GABRIELA FERREIRA DE ALMEIDA

**POTENCIAL DE UM FUNGO CERCOSPORÓIDE NO CONTROLE DA
PODRIDÃO BRANCA DO ALHO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Universidade Federal de Lavras, como parte
das exigências do Curso de Agronomia, para a
obtenção do título de Bacharel.

APROVADA em 07 de maio de 2021

Dr. Jorge Teodoro de Souza, UFLA

Dra. Rafaela Araújo Guimarães, UFLA

Dr. Valter Cruz Magalhães, UFLA

Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza Orientador

Orientador

Dr. Valter Cruz Magalhães

Coorientador

LAVRAS – MG

2021

Ao meu pai Eudes (in memoriam) por todo apoio, incentivo e amor.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha vida, por toda força e luz durante toda minha jornada, me guiando e colocando pessoas iluminadas no meu caminho.

Ao meu pai que nunca mediu esforços e sempre incentivou meus estudos e mesmo ausente fisicamente, sempre esteve espiritualmente comigo.

À minha mãe por todo amor, carinho e amizade. Aos meus irmãos Otávio e Emanuel, por compreenderem minha ausência.

Ao meu avô José por toda ajuda, incentivo e companheirismo durante minha caminhada, sem você não seria possível!

Ao meu namorado Eloy por toda compreensão, carinho e por nunca me deixar desistir durante estes anos de formação. Sem seu apoio esta jornada não seria possível!

Às minhas tias Maria José, Rosângela e Meire por todos os conselhos e ajuda em todos os momentos.

À Lavinia e a todos os meus familiares que estiveram presentes nesta trajetória. Com muito amor agradeço.

Aos meus amigos de vida David, Jéssica, Ramon e Tainara por todas as risadas matinais e companheirismo por todos estes anos.

À minha sis Andréia que mesmo distante se fez presente todos os dias.

Aos amigos que a UFLA me deu Anny, Bruna, Dalila, Fabrício, João Lucas, Larissa, Mariana Rodrigo e Vinicius, obrigada pela parceria e amizade. Amo vocês!

À amiga Flavia Penoni por ser tão parceira e compreensiva comigo.

À minha companheira Gabrielli, por todos os perrengues e conquistas juntas. Você é de Lavras para vida.

À República Sofradinha. Foi um prazer poder compartilhar anos em Lavras com pessoas tão especiais.

Ao professor Jorge por todos ensinamentos.

Aos amigos do Laboratório de Fitopatologia Molecular, Jessica, Joseph, Kize, Luisa Bastos, Larissa Maia e Valter por toda ajuda, paciência e trocas de conhecimentos.

À banca avaliadora pela disponibilidade e por contribuírem com meu trabalho.

À Universidade Federal de Lavras e Departamento de Fitopatologia pela oportunidade.

Todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus!

Romanos 8:28

RESUMO

A podridão branca que tem como agente etiológico o fungo *Stromatinia cepivora*, é uma das principais doenças da cultura do alho e pode causar grandes perdas no cultivo. *Stromatinia cepivora* é um patógeno restrito a espécies de plantas do gênero *Allium*. Em condições favoráveis (solos úmidos e temperatura entre 13 e 18°C), *S. cepivora* é capaz de formar escleródios e sobreviver por até três décadas no campo. O manejo da podridão branca é feito de maneira preventiva e envolve técnicas que visem erradicar o patógeno. A escassez de produtos eficientes no manejo dessa doença é uma realidade. Por conta disso, a busca por microrganismos que atuem como agentes de biocontrole é uma alternativa interessante para o manejo integrado dessa doença. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho é: (i) verificar o potencial de um isolado fúngico tipo Cercosporoide no controle de *S. cepivora*, analisando seu potencial de colonização e inviabilização de escleródios de *S. cepivora*; (ii) avaliar o efeito de metabólitos antifúngicos voláteis e difusíveis do fungo tipo Cercosporoide sobre o crescimento micelial de *S. sclerotiorum in vitro*. (iii) avaliar a compatibilidade entre o fungo tipo Cercosporoide e o agente de controle biológico *Trichoderma harzianum*, visando o uso combinado (iv) Testar a taxa de produção de clamidósporos em diferentes meios. O Cercosporoide apresenta maior produção de clamidósporo em meio contendo Melaço essa informação pode ser utilizada para direcionar a produção massal desse fungo. O fungo *Trichoderma harzianum* parasitou as hifas do Cercosporoide, sendo necessários estudos mais aprofundados e testes em campo para avaliação da compatibilidade. Os compostos voláteis e difusíveis produzidos pelo Cercosporoide apresentaram resultados promissores, visto que mesmo com o crescimento das colônias de *S. cepivora* as colônias ficaram inviáveis quando repicadas para uma nova placa. A identificação do isolado com base em características morfológicas não foi possível, e o provável gênero e a espécie deverão ser estabelecidos através da análise molecular para obtenção das sequências nucleotídicas de regiões específicas e realização de análises filogenéticas.

Palavras-chave: *S. cepivora*; hiperparasitismo; produção de metabólitos.

ABSTRACT

White rot, which is caused by the fungus *Stromatinia cepivora*, is one of the main diseases in the cultivation of garlic and can cause great losses in cultivation. *S. cepivora* is a pathogen restricted to the *Allium* genus. In favorable conditions (humid soils and temperature between 13 and 18°C), *S. cepivora* is able to form sclerotia and survive for up to three decades in the field. The management of white rot in the field is done preventively and it involves techniques that aims to eradicate the pathogen. The scarcity of efficient products in the management of this disease is a reality. Because of this, the search for microorganisms that act as biocontrol agents is an interesting alternative for the management of this disease. The objective of this work is: (i) to verify the potential of a Cercosporoid fungal isolate in the control of *S. cepivora*, analyzing its potential for colonization and unviability of *S. cepivora* sclerotia; (ii) to evaluate the effect of volatile and diffusible antifungal metabolites on the mycelial growth of *S. sclerotiorum* in vitro. (iii) to evaluate the compatibility between Cercosporoide and the biological control agent *Trichoderma harzianum*, aiming at the combined use. The rate of production of chlamydospores was tested in different medium. The possible Cercosporoid presents a higher production of chlamydospore in medium containing molasses this piece of information can be used to direct the mass production of structures of this fungus. The fungus *Trichoderma harzianum* parasitized the Cercosporoid hyphae, requiring further studies and field tests to assess compatibility. The volatile and diffusible compounds produced by the possible Cercosporoide showed promising results, since even with the growth of the colonies of *S. cepivora*, the colonies were not viable when transplanted to a new plate. Identification of the isolate based on morphological characteristics was not possible, and the probable genus and species must be established through molecular analysis to obtain the nucleotide sequences of specific regions and to carry out phylogenetic analyzes.

Keywords: *S. cepivora*; hyperparasitism; production of metabolites.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
REFERENCIAL TEORICO	13
A cultura do alho no Brasil	13
Podridão Branca <i>Stromatinia cepivora</i> do alho	14
Manejo de <i>Stromatinia cepivora</i>	15
<i>Trichoderma</i> como agente de controle biológico	16
Fungos Cescosporóides.....	17
OBJETIVOS	18
MATERIAIS E MÉTODOS	18
Obtenção dos isolados de <i>Stromatinia cepivora</i>	18
Obtenção do isolado de biocontrole.....	18
Seleção do substrato.....	19
Preparo da suspensão e avaliação da eficácia dos isolados como agente de controle biológico em condições “ <i>in vitro</i> ”	19
Produção de metabólitos antifúngicos voláteis.....	20
Produção de metabólitos antifúngicos difusíveis.....	20
Interação de Cercosporoide com <i>Trichoderma harzianum</i>	21
RESULTADOS E DISCUSSÕES	21
Identificação dos isolados	21
Seleção do substrato.....	23
Avaliação da eficácia dos isolados como agente de controle biológico <i>in vitro</i>	24
Produção de metabólitos antifúngicos voláteis.....	24
Produção de metabólitos antifúngicos difusíveis.....	26
Interação de Hifas	28
CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

INTRODUÇÃO

O alho (*Allium sativum* L.) está entre as principais hortaliças cultivadas no Brasil, na safra 2019/20 foi plantado aproximadamente 11.219 ha, com destaque para o estado de Minas Gerais com 3.424 ha, especialmente na Região do Alto Paranaíba. No entanto, a produção nacional ainda não é suficiente para suprir a demanda interna, sendo necessário a importação de países produtores como China e Argentina (CONAB, 2020). Os problemas fitossanitários, e as condições climáticas estão entre os principais fatores que dificultam o aumento da produtividade e a extensão de áreas de produção de alho.

Uma das principais doenças na cultura do alho é a podridão branca, que tem como agente etiológico o fungo *Stromatinia cepivora* (Berk.) Whetzel (1945) (Sin.: *Sclerotium cepivorum* Berk.). Esta enfermidade pode causar grandes perdas no cultivo, atacando desde a fase de emergência das plântulas, levando a morte antes da colheita, até o armazenamento, causando deterioração dos bulbos. Espécies de plantas do gênero *Allium* são capazes de exsudar compostos que estimulam a germinação de *S. cepivora*, tornando este patógeno restrito a plantas desse gênero. Em condições favoráveis como, solos úmidos e temperatura entre 13-18°C, *S. cepivora* é capaz de formar escleródios e sobreviver por até três décadas no campo (ENTWISTLE, 1990; DOMINGOS, 2015).

Atualmente, as estratégias de manejo da podridão branca do alho se baseiam em evitar que o patógeno seja introduzido na área, e por meio da erradicação do patógeno, sendo esta última inviável em termos práticos. Apesar de haver registro de fungicida para a cultura, a aplicação não controla a podridão-branca de forma eficiente. Com isso, a aplicação de microrganismos como agentes de controle biológico tem se apresentado uma alternativa eficaz e viável, visto a escassez e a ineficiência de produtos para esta finalidade (DOMINGOS, 2015; CÂNDIDO, 2019).

Os fungos Cercosporoides são comumente encontrados parasitando as folhas de seus hospedeiros vegetais de forma necrotrófica (SILVA, 2016). Em contrapartida, o isolado presente neste trabalho foi encontrado parasitando escleródios de *Sclerotinia Sclerotiorum* juntamente com outro agente de controle biológico empregado comercialmente (*Trichoderma harzianum*).

Desta forma, este trabalho tem com o objetivo de avaliar o potencial de um isolado fúngico tipo Cercosporóide, como agente antagonista a escleródios de *S. cepivora*, em comparação com um isolado de *Trichoderma harzianum*. Além de testar a capacidade de

produção de compostos difusíveis em meio de cultura e compostos orgânicos voláteis em condições *in vitro*, além de aspectos da sua interação direta (hiperparasitismo) com *Trichoderma harzianum*.

REFERENCIAL TEORICO

A cultura do alho no Brasil

O alho pertencente à família *Alliaceae* e é uma planta herbácea, com folhas lanceoladas, estreitas e cerosas, podendo atingir até 60 cm de altura. Em condições climáticas adequadas, exibe pendoamento, seguido de surgimento de um escapo floral que resulta na inflorescência. A inflorescência apresenta forma de umbela simples e não forma sementes botânicas. A partir do desenvolvimento das gemas do caule, ocorre a formação dos bulbilhos, que serão envoltos por uma folha de proteção, uma folha de reserva e uma folha de brotação. O caule verdadeiro é um disco comprimido sendo o ponto de partida das folhas e das raízes, que são pouco ramificadas e com profundidade variando de 20 a 30 cm. Os bulbilhos são compridos, ovoides e de forma arqueada, envoltos por uma proteção individual chamadas brácteas. Além das brácteas, ainda é envolto por várias túnicas esbranquiçadas que são facilmente destacáveis. A junção de vários bulbilhos origina o bulbo, e o número de bulbilhos em cada bulbo pode variar de 5 até 56, onde estes são conectados no caule por meio da base (FILGUEIRA, 2003; SOUZA et al., 2009; MENEZES SOBRINHO, 1978).

O cultivo do alho no Brasil teve início no período do descobrimento, com plantio limitado a pequenos cultivos por muito tempo. No século XX, o cultivo começou a se expandir no território nacional, e então houve visibilidade entre os agricultores e valor comercial ampliado. Além de utilizado como especiaria, também possui funções terapêuticas e é uma cultura de importância para os produtores, tendo em vista que é uma das principais hortaliças cultivadas no Brasil (RESENDE et al., 2016; FILGUEIRA, 2003; IBGE, 2017).

A produção nacional de alho, na safra 2019/20 foi de aproximadamente 131.523 t, com produtividade de 11,7t/ha e área média plantada de 11.219 ha. O estado de Minas Gerais é destaque de produção com uma contribuição de 40,2% da produção nacional com destaque para a Região do Alto Paranaíba, especialmente nos municípios de São

Gotardo, Ibiá e Rio Paranaíba (CONAB, 2020).

Podridão Branca *Stromatinia cepivora* do alho

O fungo *Stromatinia cepivora*, anteriormente conhecido como *Sclerotium cepivorum* pertencia ao filo *Basidiomycota*, mas em 1945, Whetzel observou semelhanças entre seus escleródios e os do fungo *Stromatinia gladioli*, e transferiu *Sclerotium cepivorum* para o gênero *Stromatinia*. Baseado em estudos utilizando técnicas moleculares, *Sclerotium cepivorum* foi reclassificado para o filo *Ascomycota*, ordem *Helotiales* e família *Sclerotiniaceae* (CARBONE; KOHN, 1993).

Stromatinia cepivora é um patógeno restrito ao gênero *Allium*, e vem sendo considerado um dos principais e mais destrutivos patógenos para a cultura do alho. Esse fato se dá por conta da liberação de compostos não voláteis na rizosfera, como sulfóxidos alilcisteína, que ocorre principalmente durante a fase de bulbificação. Estes compostos, após metabolizados pela microbiota do solo, resultam em compostos voláteis, a exemplo do dissulfeto de dialila (DADS). Tais substâncias voláteis estimulam a germinação dos escleródios de *S. cepivora*, quando o solo se encontra úmido e com temperaturas variando entre 13 e 18 °C e resultam na produção de hifas que infectam o hospedeiro. As estruturas de resistência permanecem dormentes até que plantas hospedeiras sejam cultivadas na área (COLEY-SMITH & KING, 1969; COLEY-SMITH, 1987; VOSS & MAYBERRY, 1999).

Embora haja restrição apenas para plantas do gênero *Allium*, a rotação de culturas não é um método recomendado para o manejo da doença, uma vez que os escleródios podem sobreviver no solo por 10 a 30 anos através dos microescleródios, e as áreas infestadas podem se tornar inviáveis para a produção de alho após quatro anos de cultivos sucessivos (BREWTER, 2008; DOMINGOS, 2015).

A doença é observada em reboleiras, com plantas subdesenvolvidas e amarelecimento seguido de morte das folhas afetadas. Essa doença ataca o alho desde a fase de emergência das plântulas, levando à morte da planta antes da colheita. Podendo também causar a deterioração dos bulbos sob condições de armazenamento. No bulbo, pode ser observado o crescimento micelial esbranquiçado na base da planta, seguido de podridão-mole nos tecidos, que progride para a produção de massas de pequenos escleródios pretos que dão um aspecto enegrecido aos tecidos da planta. Além disso, ocorre murcha e os bulbos começam a ser degradados, sendo

facilmente arrancadas do solo devido à morte das raízes (AMORIM et al., 2016; ENTWISTLE, 1990; NUNES & KIMATI, 2004).

Os escleródios são estruturas multicelulares de sobrevivência, resistente às condições adversas, os formados por *S. cepivora* são pequenos, de 200 a 600 µm de diâmetro, com formato esférico, e sua coloração varia de marrom à preta, de acordo com o estágio de formação. A cor escura da casca é devido à presença de melanina, que auxilia na defesa contra o dessecamento (BACKHOUSE & STEWART, 1987; CHET & HENIS, 1975; WILLETTS & BULLOCK, 1992).

Parte dos escleródios recém-formados sofre dormência, não germinando imediatamente, mesmo em condições ideais. Necessitam, portanto, de serem condicionados durante período de tempo variável no solo, para que estejam aptos a germinar (WILLETTS & BULLOCK, 1992).

A disseminação do patógeno ocorre de forma passiva dos propágulos, principalmente por movimento de maquinário e implementos agrícolas, animais, ação humana, chuva e água de irrigação. Geralmente, no primeiro ano de cultivo o inóculo inicial é baixo, no entanto, ocorre um aumento rapidamente na lavoura, tornando inviável o uso do solo para cultura do alho após quatro anos de plantio consecutivos. (ENTWISTLE, 1990; CROWE, 1995).

Manejo de *Stromatinia cepivora*

O controle biológico consiste em suprimir o patógeno ou seus efeitos destrutivos por meio da utilização de microrganismos nos sistemas agrícolas (Cook & Baker, 1983) . Agentes de controle biológico podem apresentar diversos mecanismos de atuação contra fitopatógenos. Esses mecanismos acabam reduzindo ou impedindo o estabelecimento do patógeno e como consequência ocorre a redução dos níveis de doença. Diversos microrganismos já foram descritos como eficazes para controle de doenças. Cada vez mais o uso de agentes de controle biológico vem tomando espaço entre os produtores, porém, ainda há necessidade de estudos para compreendermos melhor os mecanismos de ação, bem como aspectos das interações desses microrganismos com as plantas e os patógenos (BETTIOL et al., 2008).

Apesar de causar grandes perdas no cultivo, *S. cepivora* é um patógeno que não possui controle efetivo e tampouco produto biológico registrado. Para o sucesso dos agentes de controle biológico contra este patógeno, é necessário que os microrganismos utilizados possam se

adaptar às condições ambientais de baixa temperatura e tipo de solo em que os cultivos de alhos estão estabelecidos (CLARKSON et al., 2002). Neste sentido, é de suma importância o desenvolvimento de estudos direcionados para encontrar microrganismos que atuem como agentes de controle biológico da podridão branca nas condições específicas de cultivo do alho.

Dentre as medidas de controle da podridão branca, o uso de produtos químicos como Filtter®, Metiltiofan®, Tiltiofan®, Rovral®, Sialex®, Sumiguard®, Sumilex® e Switch®, apesar de serem os únicos com registro no MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento) para esta finalidade, a aplicação é onerosa e não controla a doença de forma eficiente. O Rovral é utilizado no tratamento dos bulbilhos sementes com intuito de evitar a introdução do patógeno em áreas ainda não infestadas. As principais medidas de manejo são de caráter preventivo, com plantio de alho semente livres da podridão branca e em áreas isentas do patógeno, além da rotação de culturas por períodos longos (DOMINGOS, 2015; CÂNDIDO, 2019).

***Trichoderma* como agente de controle biológico**

Espécies do gênero *Trichoderma* são usadas como agentes de controle biológico da podridão branca em diversos locais do mundo. Fungos desse gênero são capazes de atuar como agentes de controle de vários fitopatógenos (STEWART; McLEAN, 2007).

Como a maioria dos microorganismos de controle biológico, *Trichoderma spp.* vêm sendo testadas contra fitopatógenos radiculares, exercendo antagonismo sobre estes, parasitando-os ou inibindo seu crescimento. Algumas espécies como *T. harzianum*, *T. viride* e *T. hamatum*, *T. asperellum* entre outros, apresentaram potencial contra patógenos em cultivos (MIRANDA, 2006; ARARSA et al. 2013).

Muitas dessas espécies já estão presentes como formulados dentro do mercado brasileiro atuando contra diversos fitopatógenos. Entre os fitopatógenos que vem sendo estudados estão fungos (*Sclerotinia sp.*, *Stromatinia sp.*, *Fusarium sp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Verticillium sp.*, *Armillaria sp.*, *Roselinia sp.*), oomicetos (*Phytophthora sp.*, *Pythium sp.*), fitonematoides (*Meloydogyne sp.*), entre outros (BETTIOL, 2012; LUCON, 2017).

Fitopatogenos ocasionam perdas econômicas significativas em culturas agrícolas de importância, fazendo-se necessário o seu correto manejo e controle. Além disso, de acordo Bontempo (2016), algumas cepas são capazes de reduzir a germinação de esclerócios de *S.*

cepivora em ensaios *in vitro* (BETTIOL, 2012; ABD-EL-MOITY, 1992; MIRANDA et al., 2006; CLARKSON et al., 2002). *Trichoderma* spp. é capaz de inibir fitopatógenos por meio de competição, produção de metabólitos secundários e hiperparasitismo de estruturas de resistência de patógenos. Clarkson et al. (2014) mostram que no Reino Unido, isolados de *Trichoderma viride* e de *T. pseudokoningii* degradaram até 80% de escleródios de quatro isolados de *S. cepivora* em solo argiloso.

O isolado *T. harzianum* C52, controla *S. cepivora*, mas é altamente sensível à Tebuconazole®, Thiran® e Mancozeb® (Clarkson et al., 2002). No Brasil, a aplicação de vermicomposto juntamente com *T. harzianum* foi capaz de reduzir a viabilidade de escleródios do fungo em 98% (STEWART & McLEAN, 2007).

Fungos Cescosporóides

A etimologia do nome cercosporoide é derivada dos termos gregos “kerkos” (cauda) e “sporos” (esporos), significando fungos com conídios filiformes (Dornelo-Silva, 2014). Fungos cercosporóides são pertencentes a classe *Dothideomycetes* e ordem *Capnodiales*. Esses fungos se encontram, principalmente, na família *Mycosphaerellaceae* (SILVA, 2018).

Cercosporóides (*Capnodiales*, *Dothideomycetes*) são um dos maiores grupos de fungos anamórficos, distribuídos em uma ampla gama de hospedeiros. Com mais de 2000 espécies tradicionalmente classificadas no gênero *Mycosphaerella* Johanson, são constantemente encontrados como fitopatógenos, causando manchas e desfolhamentos, além de danos em sementes, flores e frutos (SILVA, 2016). Produzem, geralmente, esporos longos e finos, conhecidos como esporos filiformes, sendo normalmente formados sobre um tecido fúngico estromático (CHUPP, 1954).

O isolado presente neste trabalho foi encontrado parasitando escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* juntamente com o seu agente de controle biológico empregado comercialmente (*Trichoderma harzianum*).

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de um isolado fúngico Cercosporoide no controle de *S. cepivora* em condições *in vitro*, analisando o potencial de colonização e inviabilização dos escleródios. Além disso, avaliou-se mecanismos de antagonismo como, produção de compostos orgânicos voláteis e metabólitos difusíveis, bem como seus aspectos de interação no de crescimento com *Trichoderma harzianum*.

MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia Molecular do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Obtenção dos isolados de *Stromatinia cepivora*

O isolado de *S. cepivora* utilizado neste estudo foi obtido a partir de plantas doentes de alho cultivadas no município de São Gotardo, Minas Gerais. Os escleródios *S. cepivora* foram armazenados em solução salina 0,9% até o momento de uso. Para germinação dos escleródios de *S. cepivora*, as estruturas de resistência foram depositadas em placas contendo meio de cultivo Batata Dextrose Agar (BDA) e extrato de alho e foram incubadas em BOD durante 15 dias a ± 17 °C. Os escleródios germinados serviram de base para o estabelecimento de culturas puras de *S. cepivora*, que foram utilizadas nos experimentos posteriores.

Obtenção do isolado de biocontrole

Neste trabalho foi utilizado um isolado de fungo cercosporóide, para verificar seu potencial antagônico contra *S. cepivora*. A espécie não identificada, foi encontrada no solo de áreas experimentais de produção de soja, e foi isolado a partir de escleródios de *S. sclerotiorum*, patógeno que pertence à mesma família de *S. cepivora*, no município de Luminárias, Minas Gerais. O isolamento do *T. harzianum* foi realizado a partir do produto comercial Ecotrich® (Ballagro), pesando 0,1g do produto e dissolvendo em 0,9 g de água. Em Eppendorfe, a mistura foi agitada no Vórtex três vezes e coletado uma alíquota de 100 μ l, sendo adicionada a uma placa contendo BDA e espalhada com uma alça de Drigalsky.

Seleção do substrato

O isolado em estudo foi testado em diferentes meios de cultura líquido, afim de se obter informações sobre aspectos do seu crescimento e reprodução. Os meios de cultura utilizados foram, BD (200g de extrato batata; 20 g dextrose; 800mL de água destilada) BD 10% (20g de extrato batata; 20 g dextrose; 980 mL de água destilada), Meio de Aveia (extrato de aveia-20g/400 mL; 600 mL de água destilada), Malte (20 g de extrato de malte e 1L de água destilada), Melado (50g de melaço de cana; 5g glicose; 25g de NaCl; 1L de água destilada) e V8 (Suco V8; 3g CaCO₃; 800 mL de água destilada). Discos de micélio crescidos a 20 dias foram dispostos em Erlenmeyers sob agitação constante de 160 rpm a temperatura de ± 20 °C e foram colocados sob agitação em mesa agitadora orbital. Corrido o período de dez dias, foi coletado 1ml de cada Erlenmeyers e adicionado uma gota de *Tween*®, e o material foi agitado em Vórtex por três minutos. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições para cada tratamento.

Preparo da suspensão e avaliação da eficácia dos isolados como agente de controle biológico em condições “*in vitro*”

A suspensão de clamidósporo do fungo cercosporóide foi preparada a partir de placas de Petri mantidas em BOD a 17°C por 10 dias. Foi adicionado 10 mL de água destilada esterilizada e uma gota de *Tween*® em cada placa, e os esporos raspados com auxílio de uma alça de Drigalski. A suspensão foi filtrada com gaze e ajustada para concentração de 2×10^7 clamidósporos/mL. O mesmo foi feito para suspensão de conídios de *T. harzianum*.

Um disco de papel filtro esterilizado umedecido com água destilada autoclavada foi disposto em cada placa de Petri de 9cm de diâmetro. Sob o papel filtro umedecido foram colocados oito escleródios de *S. cepivora* de forma espaçada. Cada escleródio foi tratado com 2 microlitros de cada suspensão mantidos em BOD a 17°C por 14 dias. Cada placa contendo 8 microescleródios constituiu uma repetição do experimento. Os tratamentos foram

compostos pelo isolado Cercosporoide, *Trichoderma harzianum* e o controle experimental. No tratamento controle foi utilizado água destilada e autoclavada.

Após 14 dias de incubação, os escleródios foram desinfestados superficialmente com hipoclorito de sódio 1% por 5 min, seguido de álcool 70% por 2 min, três lavagens em água autoclavada por 1 min, e secos ao ar sob papel de filtro estéril. Por fim, foi realizada a transferência dos escleródios para placas contendo meio BDA e incubados em BOD a 17°C. Aos 15 dias de incubação, foi avaliado a viabilidade e a colonização dos escleródios por meio da presença de *S. cepivora* ou do agente antagonista testado. O produto comercial Ecotrich® (Ballagro) (*T. harzianum*) foi utilizado como controle positivo. O experimento foi realizado em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), contendo quatro tratamentos e dez repetições. Este experimento foi repetido duas vezes.

Produção de metabólitos antifúngicos voláteis

Para avaliar o efeito dos metabólitos voláteis produzidos pelo isolado Cercosporóide no crescimento de *S. cepivora in vitro*, foram utilizados três tratamentos constituídos pelo isolado, *T.harzianum*, o possível Cercosporoide e o patógeno como testemunha, com dez repetições para cada tratamento. Discos de micélio foram colocados a 2 cm da borda de uma placa bipartida contendo meio BDA. Os agentes de controle biológico testados foram cultivados por dois dias e discos de micélios de *S. cepivora* foram dispostos no lado oposto da placa contendo o patógeno. Após este procedimento as placas foram seladas e colocadas em BOD a ± 17 °C. O crescimento micelial foi avaliado aos 7 dias, tempo decorrido para o controle atingir a borda da placa. O experimento foi realizado em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), contendo dez repetições para cada tratamento e repetido duas vezes.

Produção de metabólitos antifúngicos difusíveis

Discos de micélio de *S. cepivora* foram colocados próximo à borda da placa de Petri contendo meio BDA. Foram colocados discos de micélio no sentido oposto dos agentes antagonistas testados (Cercosporoide e *T. harzianum*). As colônias foram separadas por um risco central realizado previamente ao posicionamento dos microrganismos. Cada antagonista constituiu um tratamento, e placas contendo apenas o fitopatógeno foram utilizadas como controle experimental. As placas foram incubadas em BOD à ± 17 °C. O crescimento micelial

foi realizado sete dias após a incubação, quando o controle atingiu a borda da placa. Foi medido o crescimento micelial na direção do risco central. O experimento foi realizado em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), contendo 10 repetições e foi repetido duas vezes.

Interação de Cercosporoide com *Trichoderma harzianum*

Posicionou-se previamente uma lamínula esterilizada entre as colônias do Cercosporoide e *Trichoderma harzianum* em meio BDA. Após o crescimento e encontro das colônias, efetuou-se o preparo das lâminas para fotodocumentação da interação entre as hifas dos dois fungos. O preparo deu-se através da adição de uma gota de glicerina sobre a lâmina e a lamínula disposta contendo as estruturas para realização das observações microscópicas.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Identificação dos isolados

Com base em características morfológicas, o isolado utilizado nesse estudo foi identificado previamente como sendo um cercosporóide, por apresentar características morfológicas semelhantes a este grupo de fungos de acordo com a literatura consultada (Ellis, 1971). No entanto, é necessário a realização do sequenciamento de regiões específicas (barcodes) que possam fornecer informações que possam ser usadas para a realização de estudos filogenéticos. Com a reconstrução filogenética será possível, ao menos saber o gênero ao qual esse isolado fúngico pertence.

Estes fungos geralmente se apresentam mais comumente em sua fase assexuada com a presença de esporodóquio. No ápice ou ao longo do conidióforo apresenta formação de célula conidiogênica holoblástica com cicatriz atenuada, de onde surgem os conídios multiseptados truncados na base e atenuados no ápice com presença de cicatriz. O crescimento em meio de cultura é lento, e nem sempre apresenta formação de conídios, apenas micélio crescendo em uma base estromática. As características descritas também estão presentes no fungo encontrado. Nos meios testados houve crescimento, mas não apresentou esporulação, apenas formação de clamidósporos que são estruturas de resistência. No meio em que foi isolado apresentava grande esporulação, e micélio denso estromatizado e escuro.

Apesar de fungos deste grupo serem encontrados como fitopatígeno, o utilizado neste estudo foi encontrado parasitando estruturas de resistências de *S. sclerotiorum* juntamente com o agente de controle biológico empregado comercialmente (*T. harzianum*) para esta finalidade.

Na figura 1 são apresentadas as características deste isolado considerado um provável Cercosporoide, descritas anteriormente.

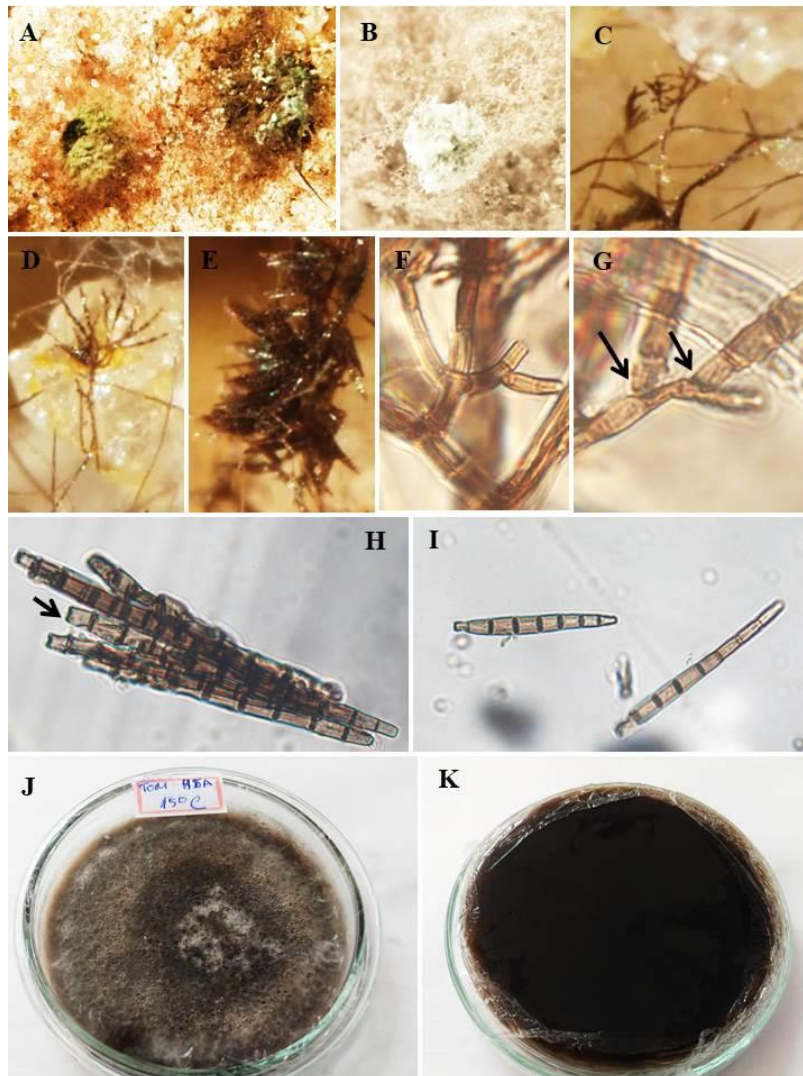


Figura 1. A-K: Características morfológicas e de crescimento do isolado provável Cercosporoide. A-B: Isolado parasitando escleródio em conjunto com *Trichoderma harzianum*. C-E: hifas, conidióforos e conídios vistos ao microscópio estereoscópico (lupa). F-I: estruturas vistas sob o microscópio ótico. G: as setas mostram a célula conidiogênica presente no conidióforo de onde saem os conídios. H: Conjunto de conídios. I: Conídios solitários. J-k: crescimento em meio de cultura BDA a 15°C mostrando frente e verso da placa de Petri.

Seleção do substrato

Na contagem de clamidósporos em diferentes meios de cultura foi observado que o *Cercosporoide* aproveitou de maneira mais eficiente o meio de cultura contendo melaço, produzindo 80 clamidósporos/MI diferindo demais meios de cultura avaliados.

O meio Malte e de Aveia promoveu um bom desempenho na taxa de contagem de clamidósporos do *Cercosporoide*, diferenciando dos meios de BD, V8 e BD 10% que proporcionaram as menores taxas de contagem, respectivamente (Figura 2). Com contagens relativamente altas entendemos uma adequação do Melado às exigências do fungo.

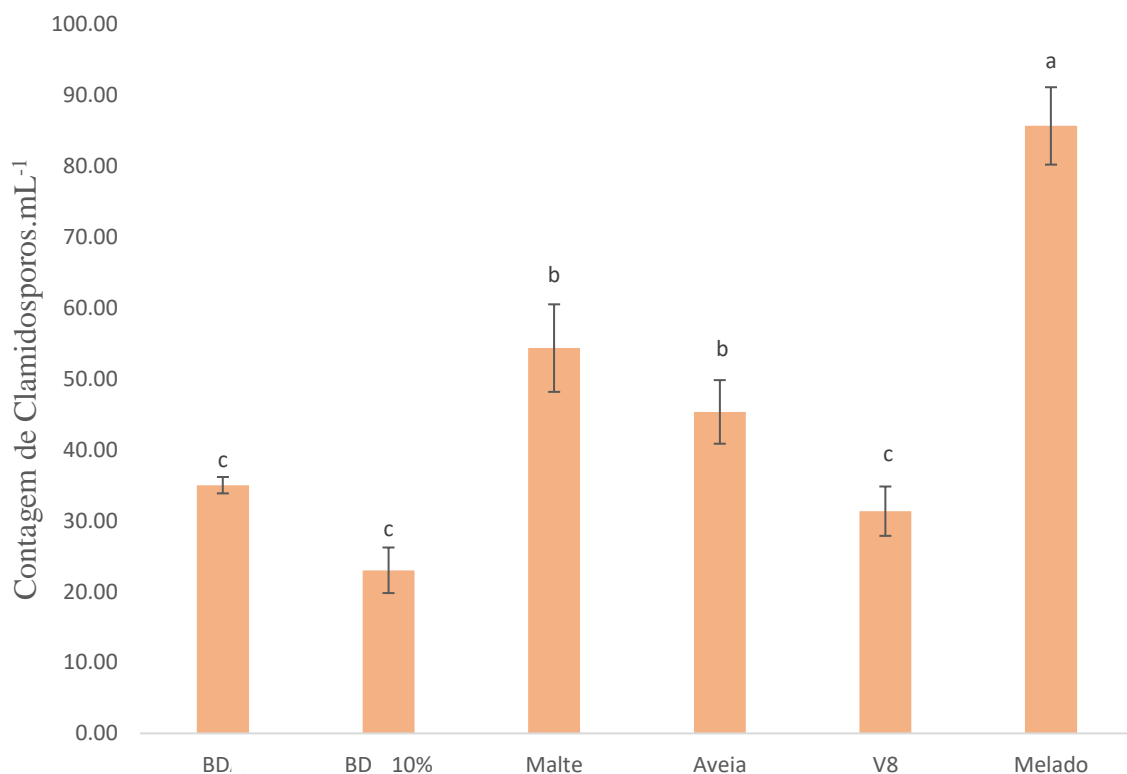


Figura 2- Produção de clamidósporo/ml de *Cercosporoide* em diferentes meios de cultura. As médias seguidas da mesma letra não apresentam diferença significativa a nível de 5% pelo teste Scott-Knoot.

Avaliação da eficácia dos isolados como agente de controle biológico *in vitro*

As placas contendo os escleródios do tratamento testemunha foram tratados apenas com água. O tratamento controle apresentou crescimento de 100% de *S. cepivora*, excluindo-se então a probabilidade de ter acontecido contaminação com os outros microorganismos.

Em relação a *T.harzianum* este apresentou menor porcentagem de germinação de *S. cepivora* em relação ao Cercosporoide que apresentou baixa taxa de colonização de escleródios.

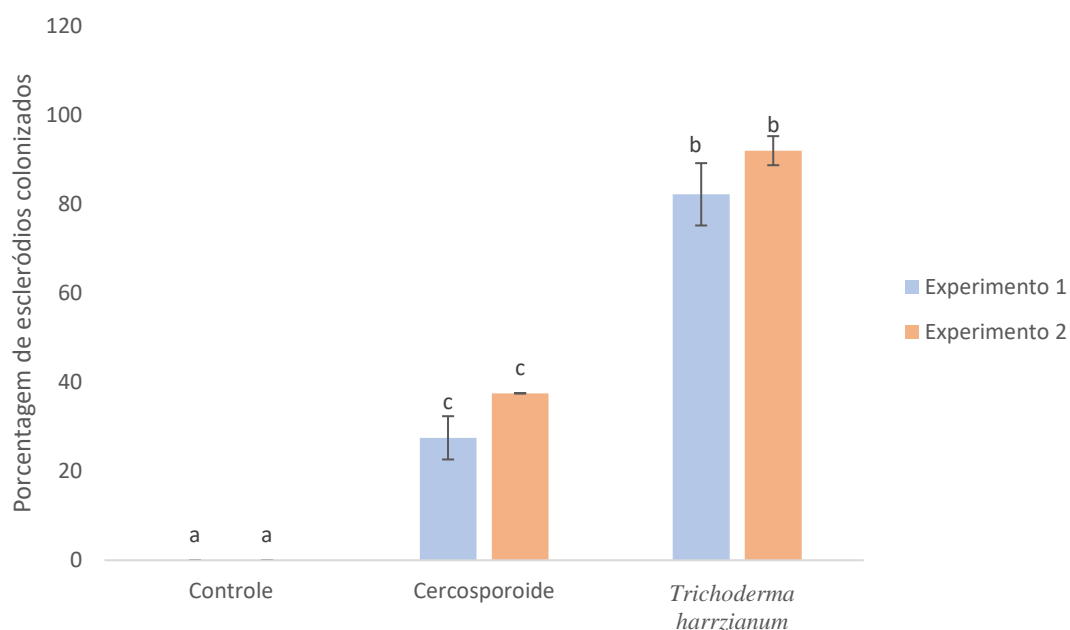


Figura 3- Porcentagem de escleródios colonizados por potenciais agentes de controle biológico em ensaios *in vitro* a 17°C. As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Produção de metabólitos antifúngicos voláteis

O experimento de inibição através de compostos voláteis produzidos pelos microrganismos mostrou menor crescimento e maior percentual de inibição da colônia de *S. cepivora* pelos compostos produzidos por *T. harzianum*. As placas contendo apenas as colônias

de *S. cepivora* apresentaram crescimento até a borda, excluindo a probabilidade contaminação (Figura 4).

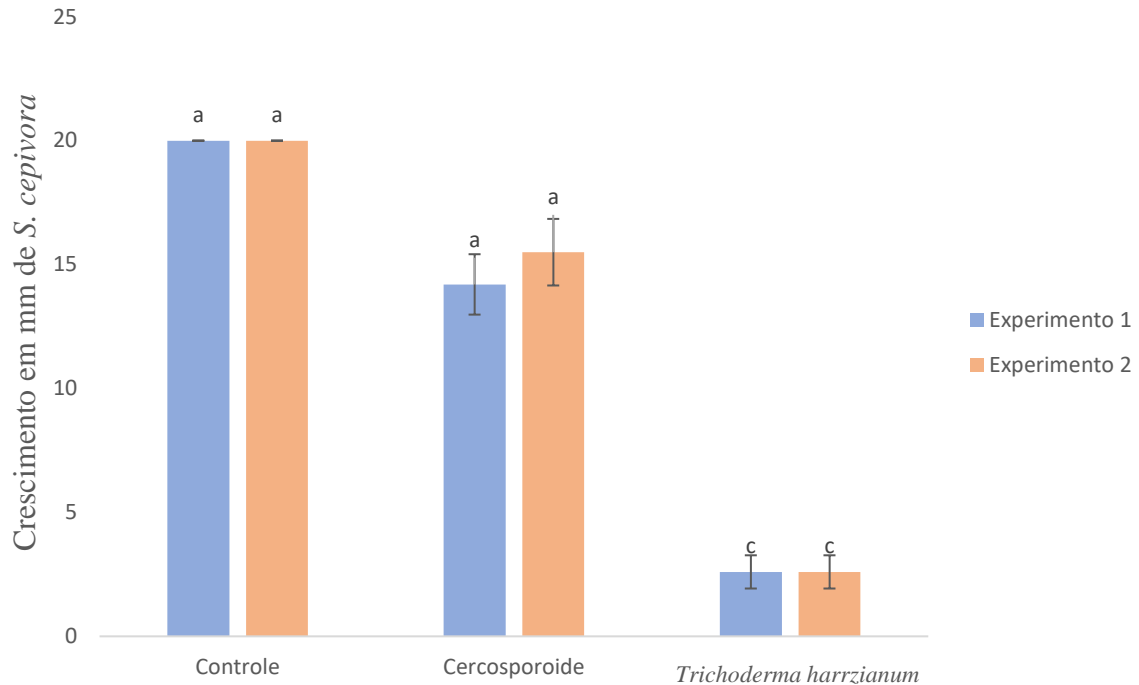


Figura 4 – Crescimento da colônia de *S. cepivora* na presença da produção de metabólitos antifúngicos voláteis. As médias seguidas da mesma letra não apresentam diferença significativa a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Apesar do possível Cercosporoide não apresentar um nível de inibição satisfatória, foi possível observar que as colônias de *S. cepivora* crescidas na presença dele sofreram coloração melanizada e após repicadas para uma nova placa não houve crescimento, mostrando a inviabilidade das colônias. Embora os compostos voláteis do isolado cercosporoide não tenha sido capaz de inibir o todo o crescimento micelial, esses compostos foram capazes de causar a inviabilização das estruturas de reprodução do patógeno.



Figura 5- Crescimento da colônia de *S. cepivorum* na presença de voláteis produzidos pelo possível Cercosporoide com 14 dias, em meio BDA.

Produção de metabólitos antifúngicos difusíveis

Com relação à produção de metabólitos antifúngicos difusíveis, a Figura 6 apresenta o crescimento do fungo (mm). Observa-se que houve inibição do crescimento da colônia de *S. cepivora* na direção de *T. harzianum*, sugerindo a produção de compostos que inibem o desenvolvimento da colônia, sendo este efeito mais acentuado que aquele verificado no possível Cercosporoide. O efeito inibitório apresentado por *T. harzianum* foi mais pronunciado que o apresentado pelo isolado cercosporoide, esse resultado é válido uma vez que existe um real efeito inibitório.

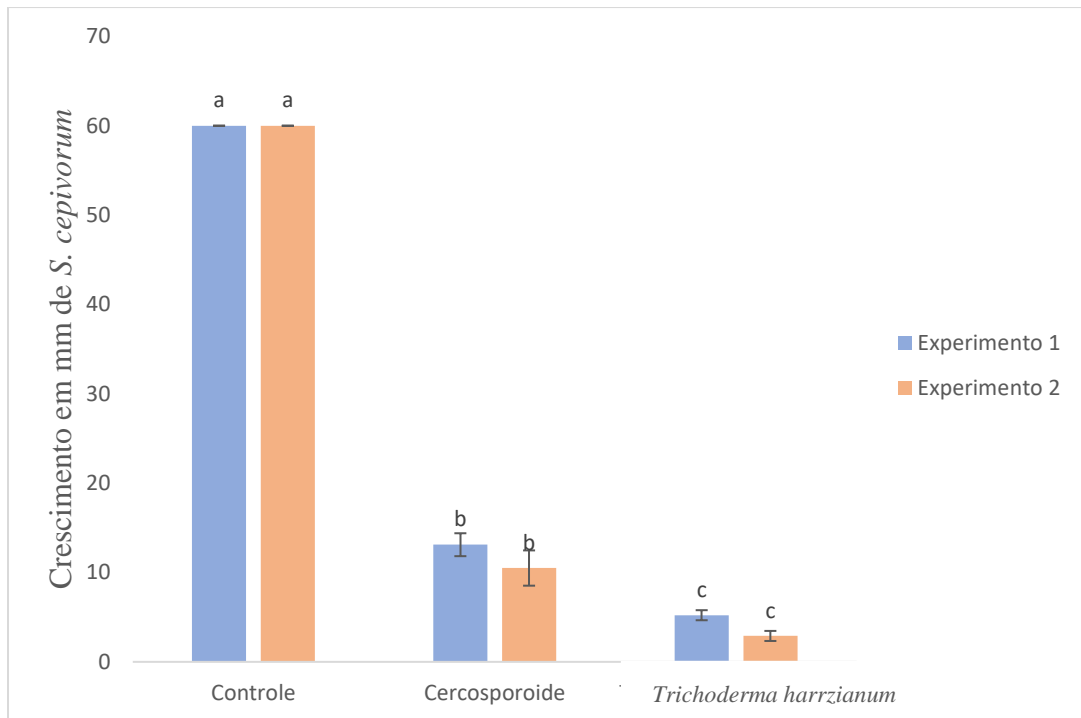


Figura 6 – Crescimento da colônia de *S. cepivora* na presença da produção de metabólitos antifúngicos difusíveis. As médias seguidas da mesma letra não apresentam diferença significativa a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Assim como no experimento de metabólitos voláteis, as colônias de *S. cepivora* crescidas na presença do possível Cercosporoide apresentaram coloração melanizada, e o mesmo procedimento de repicagem para uma nova placa foi realizada e avaliado com sete dias e não houve crescimento.



Figura 7- Crescimento da colônia de *S. cepivora* na presença de metabólitos difusíveis do Cercosporoide com 14 dias em meio BDA.

Interação de Hifas

É importante conhecer antes de lançar mão de estratégias de manejo a compatibilidade e efetividade dos agentes e quais são as características passíveis de serem manipuladas para tornar o biocontrole viável. A compatibilidade entre estes agentes é de suma importância para compreendermos se há antibiose ou simbiose entre os agentes.

Com base neste estudo verificaram-se uma possível forma de parasitismo, onde houve a formação de estruturas semelhantes a ganchos por *T. harzianum*, que cresce em direção aos feixes de hifas do possível Cercosporoide. Entretanto no local de isolamento o fungo provável cercosporoide apresentou crescimento anterior ao crescimento de *Trichoderma*, pois o cercosporoide apresenta ótimo desenvolvimento em temperaturas mais baixas. baixas e *Trichoderma* já não se saí muito bem em condições de baixa temperatura. Isso pode ser um fator interessante, pelo qual esse fungo pode ser um potencial agente de biocontrole para ser testado em condições de campo, onde a doença ocorre.

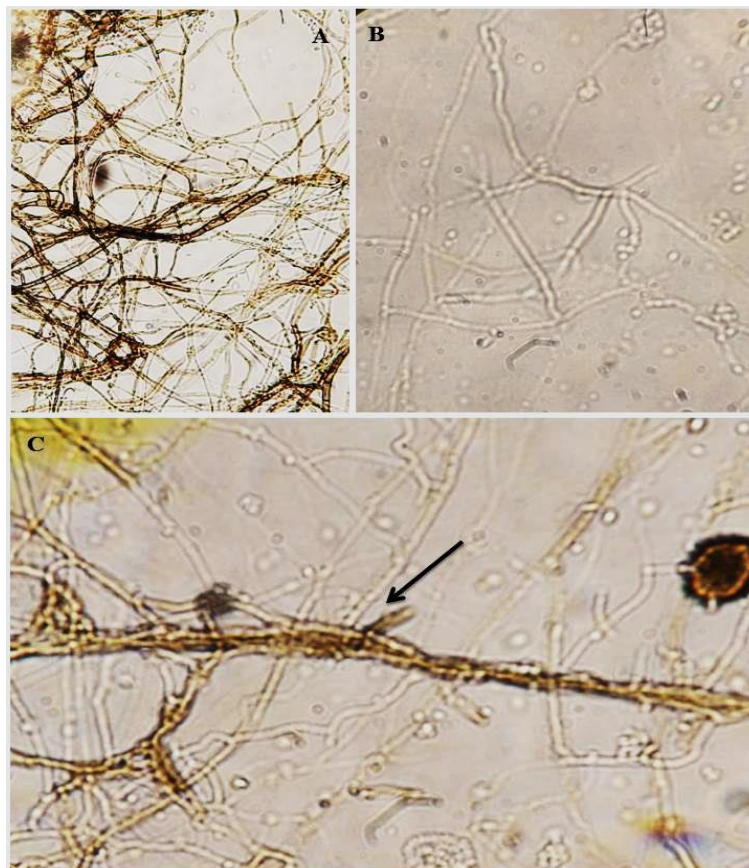


Figura 8- A-C: crescimento de micélio em meio de cultura. A: provável Cercosporoide apresentando hifa escura. B: Hifas e conídios de *Trichoderma*. C: Interação entre o Cercosporoide e *Trichoderma* (a seta representa o parasitismo de *Trichoderma harzianum* sobre o Cercosporoide).

CONCLUSÃO

Com as limitações que existem em se classificar organismos apenas com base em dados morfológicos, o provável gênero e a espécie deverão ser estabelecidos através da análise molecular para obtenção das sequencias filogenéticas. O possível Cercosporoide apresenta maior produção de clamidósporo em meio contendo melão, o que deve ser utilizado para produção massal e futura formulação. Os compostos voláteis e difusíveis produzidos pelo Cercosporoide apresentaram resultados promissores, visto que mesmo com o crescimento das colônias de *S. cepivora* as colônias ficaram inviáveis quando repicadas para uma nova placa. Os dados de hiperparasitismo não foram satisfatórios, sendo necessário mais estudos com diferentes concentrações. O fungo *T harzianum* parasitou as hifas do Cercosporoide, sendo necessários estudos mais aprofundados e testes em campo para avaliação da compatibilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-EL-MOITY, T. H.; SHATLA, M. N. Biological control of white rot disease of onion (*Sclerotium cepivorum*) by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathologische Zeitschrift*, v. 100, n. 1, p. 29-35, 1981.

ABD-EL-MOITY, T. H. The use of *Trichoderma* spp. to control soilborne plant pathogens in Egypt. In: *Biological Control of Plant Diseases*. Springer, Boston, MA, p. 255-258, 1992.

ARARSA, L.; THANGAVEL, S. Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma* species for the control of onion white rot (*Sclerotium cepivorum* Berk). *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 2013.

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; CAMARGO L. F. A. *Manual de Fitopatologia - Volume 2*. Editora: Agronômica Ceres. 5ª Edição, 2016

BACKHOUSE, D.; STEWART, A. Anatomy and histochemistry of resting and germinating sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. *Transactions of the British Mycological Society*, v. 89, p. 561-567, 1987.

BETTIOL, W.; GHINI, R.; MORANDI, M. A. B.; STADNIK, M. J.; KRAUSS, U.; STEFANOVA, M.; COTES PRADO, A. M. *Controle biológico de doenças de plantas na América Latina*. Embrapa Meio Ambiente, 2008.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, Z. V.; PAULA JUNIOR, T. J.; CORREA, E. B., M, A. B.; LUCON, C. M. M.; COSTA, J. C. B., BEZERRA, J. L. *Produtos Comerciais a Base de Agentes de Biocontrole de Doenças de Plantas*. Embrapa Meio Ambiente, Documento 88, 155, 2012.

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.

BREWSTER, J. L. Onions and Other Vegetable Alliums, 2nd Ed. Crop Production Science in Horticulture Series, Volume 15, 2008.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. Ribosomal DNA sequence divergence within internal transcribed spacer 1 of the Sclerotiniaceae. *Mycologia*, v. 85, n. 3, p. 415-427, 1993.

CHET, I.; HENIS, Y. Sclerotial morphogenesis in fungi. *Annual Review of Phytopathology*, v. 13, p.169-192, 1975.

COLEY SMITH, J. R. Alternative methods of controlling white rot disease of Allium, in *Innovative Approaches to Plant Disease Control*, Edited by Chet, I., John Wiley and Sons, New York, p.161-177, 1987.

COLEY-SMITH, J. R. Studies of the biology of *Sclerotium cepivorum* Berk. III. Host range; Persistence and viability of sclerotia. *Annals of Applied Biology*, v. 47(3), p. 511-518, 1959.

COLEY-SMITH, J. R. and KING, J. E. The production by species of Allium of alkyl sulphides and their effects on the germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* Berk. *Annals of Applied Biology*, v. 64, p. 289-301, 1969.

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

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento): [file:///C:/Users/Bruger/Downloads/AlhoZ-ZAnaliseZmensalZ-ZSetembroZ2020%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Bruger/Downloads/AlhoZ-ZAnaliseZmensalZ-ZSetembroZ2020%20(1).pdf)

CHUPP, C. A monograph of the fungus genus *Cercospora*. Ithaca, New York, 667 pp., 1954.

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 a 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, p. 353-362, 2004.

CROWE, F.J. White rot. In: SCHWARTZ, H.F.; MOHAN, S.K. (Eds). Compendium of Onion and Garlic Diseases. St Paul: APS Press, 1995. p. 14-16.

CROUS, P. W.; APTROOT, A.; KANG, J. C.; BRAUN, U.; WINGFIELD, M. J. The genus *Mycosphaerella* and its anamorphs. *Studies in Mycology*, v. 45, p. 107-121, 2000.

CROUS, P. W., LIEBENBERG, M. M., BRAUN, U., AND GROENEWALD, J. Z. Reevaluating the taxonomic status of *Phaeoisariopsis griseola*, the causal agent of angular leaf spot of bean. *Studies in Mycology*, v. 55, p. 163-173. 2006.

CROUS, P. W.; BRAUN, U.; HUNTER, G. C.; et al. Phylogenetic lineages in *Pseudocercospora*. *Studies in Mycology*, v. 75, p. 37-114, 2013.

DORNELO-SILVA, D. Fungos associados a plantas da família Vochysiaceae presentes no Cerrado. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. Brasília, 96p., 1999.

DOMINGOS, Luisa Bastos et al. DIALIL DISSULFETO INDUZ A GERMINAÇÃO DE *Sclerotium cepivorum*. DA PODRIDÃO-BRANCA, PANORAMA GERAL. Podridão-branca do alho e da cebola. **Avanços Tecnológicos Aplicados à Pesquisa na Produção Vegetal**, p. 139, 2015.

ELLIS, Martin Beazor et al. Dematiaceous hyphomycetes. *Dematiaceous hyphomycetes.*, 1971.

ENTWISTLE, A. R. Root diseases, in Onions and Allied Crops. In: RABINOWITCH, H.D.; BREWSTER, J.L. (Ed.). *Agronomy, Biotic Interactions, Pathology, and Crop Protection*. Florida: CRC Press, 1990. p. 103-154.

FILGUEIRA, F. A. R. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV, 412 p., 2003.

LEWIS, J. A.; PAPAVIDAS, G. C. Production of chlamydospores and conidia by *Trichoderma* spp in liquid and solid growth media. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 15, n. 3, p. 351-357, 1983.

LUCINI, M. A. Manual prático de produção de alho. 2ª ed. Curitiba: GRN. 140p., 2004.

LUCON, C.M.M.; CHAVES, A.L.R.; BACILIERI, S. *Trichoderma: o que é, para que serve e como usar corretamente na lavoura*. São Paulo. 28p. 2014.

LOURENÇO JR, Valdir, et al. "Etiology, epidemiology, and management of white rot on onion and garlic: current knowledge and future directions for Brazil." *Científica* 46.3 (2018): 241-256.

MARTINS-CORDER, M. P.; DE MELO, I. S. Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* Kleb. **Scientia Agricola**, v. 55, n. 1, p. 1-7, 1998.

MIRANDA, M. E. A.; ESTRELLA, A. H.; CABRIALES, J. J. P. Colonization of the rhizosphere, rhizoplane and endorhiza of garlic (*Allium sativum* L.) by strains of *Trichoderma harzianum* and their capacity to control allium white-rot under field conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 38, n. 7, p. 1823-1830, 2006.

NUNES, M. E. T.; KIMATI, H. Doenças do alho e da cebola (*Allium sativum* L. e *Allium cepa* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L. (ed.). *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, 1997. p. 49-64.

PEREIRA, R. B.; OLIVEIRA, V. R.; PINHEIRO, J. B. Diagnose e manejo de doenças fúngicas na cultura da cebola. Circular técnica 133, p. 2-12. Brasília, 2014.

RESENDE, F. V.; HABER, L. L.; PINHEIRO, J. B.; MELLO, A. F. S. Produção de alho-semente: parte I. *Revista Nosso Alho, Brasília - DF*, p. 43-55, 2016.

SILVA, Aline Suelen da. Epitepificação e relacionamento filogenético de fungos cercosporoides associados a plantas do Cerrado. 2018.

SILVA, Meiriele da. Exploring fungal diversity: *Passalora*, *Pseudocercospora*, *Sirosporium* and *Zasmidium* on Brazilian plants. 2016. 103f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2016.

STEWART, A.; MCLEAN, K.L. Biological control of onion white rot. In: CHINCHOLKAR, S.B.; MUKERJI, K.G. (Eds). *Biological Control of Plant Diseases*. New York: The Haworth Press, 2007. p.123-148.

VIEIRA, B. S. et al. Potencial antagonístico do isolado bacteriano (BSV-05) contra os patógenos radiculares do feijoeiro: *Fusarium* spp., *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani*. *Revista Ciência Agrícola*, v. 14, n. 1, p. 59–66, 2017.

VOSS, R. E.; MAYBERRY, K. S. Fresh market bulb onion production in California, Vegetable Research and Information Center, Vegetable Production Series, publication 7242. 1999.

WILLETTS, H.J.; BULLOCK S. Developmental biology of sclerotia. Mycological Research, v. 96, p. 801-816, 1992.