

# Controlo de *Sclerotinia homoeocarpa* em relva com compostos de resíduos orgânicos

## *Sclerotinia homoeocarpa* control on turfgrass with organic residues composts

Luísa Coelho<sup>1,2,3\*</sup>, Lúcia Dionísio<sup>1,2</sup>, Carlos Guerrero<sup>1,2</sup> e Mário Reis<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Universidade do Algarve, Campus de Gambelas 8005-139 Faro, Portugal

<sup>2</sup>MeditBio, Universidade do Algarve. Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal

<sup>3</sup>ICAAM, University of Évora, Núcleo da Mitra apartado 94 7006-554, Évora, Portugal

(\*E-mail: lcoelho6@gmail.com)

<https://doi.org/10.19084/RCA.17076>

Recebido/received: 2017.12.22

Aceite/accepted: 2018.12.27

### RESUMO

Os relvados são suscetíveis a doenças causadas por fungos, sendo *Sclerotinia homoeocarpa* um dos que causa maiores prejuízos em muitos países. A compostagem permite a valorização e tratamento de resíduos orgânicos, originando compostos com aplicações agrícolas, nomeadamente para controlo de doenças causadas por patogénicos do solo. Produziram-se dois compostos, designados P1 e P2, por compostagem de resíduos agroindustriais, em pilhas com arejamento por reviramento. Desde o final da fase termofílica até ao final dos processos de compostagem recolheram-se amostras onde se isolaram e identificaram fungos presentes em ambos os compostos. Dos isolados, 26 apresentaram potencial antagonista, sendo 12 provenientes de P1 e 14 de P2. Realizaram-se ensaios *in vitro*, pelo método de confrontação direta, para avaliar a capacidade antagonista destes fungos para *S. homoeocarpa*. Doze dos isolados, dos géneros *Trichoderma*, *Fusarium* e *Bionectria*, impediram o crescimento de *S. homoeocarpa*, com taxas de inibição entre 52 e 68%. Os compostos obtidos foram também testados, *in vivo*, em relva (*Agrostis stolonifera* L.) cultivada em vaso. No cultivo em vaso, usando os compostos como substratos, verificou-se redução da área de relva afetada pela doença, principalmente em P2. Os compostos testados controlaram *S. homoeocarpa* tanto *in vitro* como em vaso destacando-se o composto P2.

**Palavras-chave:** antagonista, biocontrolo, compostagem, sustentabilidade, *Agrostis stolonifera* L.

### ABSTRACT

Turfgrass is susceptible to several fungal diseases, being *Sclerotinia homoeocarpa*, the causal agent of dollar spot, which causes the greatest turfgrass losses in several countries. Composting allows the valorization and treatment of organic wastes, producing organic composts with agricultural applications as soil amendments and as biological control agents of soil-borne diseases. Two composts were produced, P1 and P2, through the composting of agro-industrial wastes in piles with mechanical turning. From the end of the thermophilic phase until the end of the composting process, fungi from both composts were isolated and identified. From the isolates, twenty-six showed potential antagonistic activity, being 12 from P1 and 14 from P2. Their antagonistic capacity was evaluated using the method of direct confrontation. From the isolates, 12 of them, belonging to the genus *Trichoderma*, *Fusarium* and *Bionectria*, prevented *S. homoeocarpa* growth and development on turfgrass, with a disease inhibition rate between 52 and 68%. Both composts were also tested as substrates for turfgrass (*Agrostis stolonifera* L.). In the *in vivo* trials, the area of turfgrass with disease decreased, particularly in the pots containing P2 compost. The tested composts effectively controlled *S. homoeocarpa* growth both *in vitro* and in the pot trials, especially the P2 compost.

**Keywords:** antagonist, biocontrol, composting, sustainability, *Agrostis stolonifera* L.

## INTRODUÇÃO

A compostagem é um processo biológico controlado, durante o qual a atividade microbiana permite converter resíduos diversos num produto final estável, de mais fácil aplicação em agricultura (Barker, 2001; Batista e Batista, 2007). Durante a fase termofílica atingem-se temperaturas elevadas que reduzem ou eliminam a presença de alguns agentes patogénicos (Day e Shaw, 2005). Terminada esta fase, o composto é recolonizado por organismos mesofílicos, nomeadamente: fungos, bactérias, entre as quais actinomicetes, protozoários e nemátodes. Entre estes organismos figuram antagonistas ou agentes de controlo biológico que, colonizando os compostos, podem contribuir para a proteção das plantas, prevenindo, reduzindo ou controlando o desenvolvimento de agentes patogénicos do solo. Esta propriedade, manifestada por alguns compostos e conhecida por capacidade supressiva, permite proteger plantas suscetíveis a determinados agentes patogénicos, mesmo na presença destes (Pane e Zaccardelli, 2014; Reis, 2016). A capacidade supressiva pode ser devida à competição por nutrientes, antibiose ou hiperparasitismo (Hoitink *et al.*, 1997). A compostagem de resíduos ricos em quitina favorece o crescimento de organismos com capacidade para a degradar, reforçando o potencial supressivo dos compostos (Sharp, 2013).

O Algarve é uma região reconhecida como sendo o melhor destino de golfe da Europa, com cerca de 2000 ha de relvados. É importante manter os relvados em boas condições fitossanitárias e reduzir o uso de pesticidas, devido não só aos problemas ambientais que a sua aplicação acarreta, mas também devido ao contacto direto com jogadores e as equipas de manutenção dos relvados. Paralelamente, a aplicação da Diretiva n.º 2009/128/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 21 de outubro, através da Lei n.º 26/2013 de 11 de abril, reduziu significativamente a quantidade de substâncias ativas homologadas, disponíveis para a aplicação em relvados.

*Sclerotinia homoeocarpa* é um fungo fitopatogénico que, a temperaturas entre 15 e 30°C e humidade relativa elevada, pode causar uma doença nos relvados, vulgarmente conhecida por “dollar spot”, caracterizada pelo aparecimento de manchas dispersas

de pequeno diâmetro (Walsh *et al.*, 1999). O corte frequente do relvado contribui para o desenvolvimento do micélio do fungo, e a sua disseminação faz-se através do equipamento de manutenção do campo, pessoas, animais e água (Walsh *et al.*, 1999). Antes de se recorrer à luta química, o controlo de pragas e doenças deverá passar por diferentes meios de luta, onde a aplicação de compostos orgânicos desempenha um papel importante como medida ecológica e sustentável para a proteção das plantas. Os compostos orgânicos, através da atividade dos microrganismos que transportam ou que estimulam no solo, são uma solução alternativa e atrativa de controlo biológico, reduzindo a utilização de produtos fitofarmacêuticos (Barker, 2001; Trillas *et al.*, 2006; Sant *et al.*, 2011).

Neste trabalho estudou-se a capacidade supressiva de dois compostos orgânicos, provenientes de resíduos agroindustriais, tendo-se isolado e identificado fungos potencialmente antagonistas e testado o seu efeito *in vitro*. Estudou-se também a capacidade supressiva dos compostos obtidos na cultura de relva em vaso.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Obtenção dos compostos*

Obtiveram-se dois compostos, designados por P1 e P2, através da compostagem de resíduos agroindustriais, em pilhas com arejamento por reviramento. O composto P1 resultou da compostagem de laranjas, aparas de relva e bagaço de uva, na proporção de 0,9:1,1:1 (v/v), e o P2 da compostagem de uma mistura com os mesmos resíduos, mas à qual se adicionou o resíduo da produção de cogumelos (0,5 v/v), rico em quitina, obtendo-se a proporção de 1,8:0,2:1,5:0,5 (v/v). Durante a compostagem monitorizaram-se parâmetros físico-químicos das misturas. A temperatura foi medida diariamente na zona central das pilhas (Sonda TP 62, Umwelt Elektronik GmbH & Co.KG, Alemanha); o pH foi medido em extrato aquoso (1:2 p/v) com potenciómetro (Crison Micro pH 2001, Espanha), e a condutividade elétrica (CE) foi medida no mesmo extrato após filtração, com condutivímetro (Crison 522, Espanha). Determinaram-se os teores de matéria orgânica (Ramos *et al.*, 1987), de matéria seca (Martinez, 1992), de azoto Kjeldhal e calculou-se

a relação C/N. A nível microbiológico, contou-se o número de unidades formadoras de colónias (ufc) de fungos, bactérias heterotróficas, actinomicetes, organismos celulolíticos e quitinolíticos. Para a quantificação dos fungos usou-se o meio *Potato Dextrose Agar* (PDA), para as bactérias heterotróficas *Plate Count Agar* (PCA) e para actinomicetes o meio PCA com metade da concentração recomendada pelo fabricante (1/2 PCA). As culturas de fungos, bactérias heterotróficas e actinomicetes foram incubadas a duas temperaturas:  $25 \pm 1$  e  $55 \pm 1$  °C, durante 24 horas. Os microrganismos quitinolíticos aeróbios foram isolados em Meio Mineral Salino (MSM) sólido com adição de quitosano, durante 5 dias a  $28 \pm 1$  °C, e os celulolíticos aeróbios em MSM líquido (Alfano *et al.*, 2011), durante 15 dias a  $37 \pm 1$  °C. Para avaliar a qualidade agronómica dos compostos fizeram-se testes de fitotoxicidade (Zucconi *et al.*, 1985), aos 42, 77 e 112 dias de compostagem com mastruço (*Lepidum sativum* L.) como planta indicadora.

### Isolamento de antagonistas

Desde o final da fase termofílica até ao final da compostagem foram isolados e identificados os fungos dos compostos com eventual capacidade antagonista. Para tal, estes microrganismos, foram repicados sucessivamente, até à obtenção das suas culturas puras. Por macro e microscopia observaram-se as características culturais e morfológicas para identificação dos géneros a que pertenciam os fungos isolados dos compostos. Os isolados que apresentaram potencial antagonista foram numerados de 1 a 26. A identificação a nível das espécies dos fungos com maior capacidade de inibição de *S. homoeocarpa*, foi realizada através de técnicas de biologia molecular. Procedeu-se à extração do DNA do micélio cultivado em meio PDA. As amostras do DNA obtido foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando os primers *ITS1* e *ITS4* (White *et al.*, 1990), sendo o produto obtido posteriormente sequenciado.

### Ensaio de antagonismo in vitro

Para avaliar a capacidade antagonista dos microrganismos isolados, usou-se como agente patogénico um isolado de *S. homoeocarpa* cedido pela

Universidade de Sevilha. Os ensaios efetuaram-se em placas de Petri contendo PDA, pelo método de confronto direto, usando-se para o efeito dois discos com 6,5 mm de diâmetro: um com micélio do agente patogénico e o outro com micélio do antagonista, distanciados 3 cm entre si. Para determinar a percentagem de inibição (IP) em PDA foram também colocados discos de 6,5 mm de cada fungo, que cresceram isoladamente. Diariamente, mediram-se os raios das zonas de crescimento de cada fungo, para determinação da percentagem de inibição, de acordo com a fórmula (1):

$$IP = \frac{(Rc - R1)}{Rc} \times 100, \quad (1)$$

em que:

Rc = raio da zona de crescimento, em mm, do patogénico que cresceu isoladamente;

R1 = raio da área de crescimento, em mm, do patogénico que cresceu na presença do antagonista.

No final do ensaio avaliou-se o tipo de interação entre as colónias, de acordo com Magan e Lacey (1984).

### Ensaio de supressividade dos compostos orgânicos in vivo

Para avaliar a capacidade supressiva dos compostos obtidos (P1 e P2), usou-se como controlo turfa loira, T (Hansa Torf, Floragard, Alemanha). O delineamento experimental consistiu em blocos completos casualizados, com quatro repetições e seis substratos (modalidades): P1, P2, T e P1t, P2t e Tt, tendo sido os últimos três sujeitos a tratamento térmico (t) a 60 °C durante 7 dias, com o objetivo de eliminar os microrganismos e comprovar a origem biológica da supressividade. Cada substrato foi colocado em vasos de 100 mL (5 vasos por modalidade) e semeado com relva (*Agrostis stolonifera* L.) numa densidade correspondente a 10 g de semente m<sup>-2</sup>. Quando a relva ocupou toda a superfície dos vasos, procedeu-se à inoculação com um disco com o micélio de *S. homoeocarpa* (6,5 mm de diâmetro), cultivado em meio PDA durante 7 dias. As plantas foram observadas, diariamente, para deteção dos sintomas iniciais da doença e, a partir daí, semanalmente, para determinação da

incidência da doença [(número de vasos afetados pela doença/número total de vasos) x 100] e da sua severidade, calculada através da área afetada. Para determinar a área ocupada pela doença comparou-se a área afetada utilizando uma quadrícula inscrita em folha de acetato transparente, com 0,5 cm de lado. Contou-se o número de quadrículas correspondentes à área de expansão da doença e expressou-se a área afetada em cm<sup>2</sup>. A severidade da doença foi determinada a partir da área afetada, de acordo a escala definida por Baayen e Van der Plas (1992), onde: 0 = sem sintomas (0 % de área afetada); 1 = muito pouco infetada (até 5 % de área afetada); 2 = pouco infetada (≥ 5 e < 20 %); 3 = sintomas bem desenvolvidos (≥ 20 % e < 50 %); 4 = sintomas de doenças fortes em toda a área (≥ 50 % e < 80 %); 5 = área totalmente afetada (≥ 80 % e ≤ 100 %). Determinou-se a variável Área sob a curva de progresso da doença (AUDPC, *area under disease progress curve*) por vaso, usando a Severidade da doença entre o aparecimento dos sintomas e o final do ensaio, e dividindo pelo número de dias, de acordo com a fórmula:

$$\sum_{i=1}^n \left( \frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i), \quad (2)$$

em que:

y = severidade da doença

t = tempo (dias)

No final do ensaio, para cada modalidade, foram quantificadas as populações de *Trichoderma* spp. e de *Sclerotinia* spp., em meios de cultura semi-seletivos, de acordo com Chung e Hoitink (1990) e Steadman *et al.* (1994), respetivamente, registando-se também o pH e CE dos substratos.

### Analise estatística

As características dos compostos foram sujeitas a uma análise de comparação de médias e ao teste *t-student*. Os resultados dos ensaios *in vitro* e *in vivo* foram sujeitos a uma análise da variância e ao teste de comparação de médias de Duncan (Field, 2009), através do programa de estatística SPSS® (versão 20,0, SPSS Inc.).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Características dos compostos obtidos

#### Propriedades físico-químicas

Os compostos obtidos apresentaram teores elevados de matéria orgânica, superiores a 60%, tal como recomendado por Ferreira *et al.* (2002), atingindo cerca de 76 % em P2. Ambos os compostos apresentaram valores de pH neutro (Quadro 1), que se encontra no intervalo recomendado por Ferreira *et al.* (2002). A condutividade elétrica apresentou valores compatíveis com a utilização agrícola dos compostos (Brinton, 2000). O teor de azoto total apresentou valores superiores ao valor recomendado por Ferreira *et al.* (2002), maior em P1, provavelmente devido ao maior conteúdo em aparas de relva na mistura compostada (Quadro 1).

**Quadro 1** - Características físico-químicas dos compostos orgânicos obtidos

	MO (%)	N (%)	MS (%)	pH	CE (dS m <sup>-1</sup> )	C/N
P1	61,9***	1,86**	49,0**	7,03**	2,12***	19,3***
P2	76,3***	1,46**	45,9**	7,32**	3,34***	29,7***

P1, composto P1; P2, composto P2; MO (%), percentagem de matéria orgânica; N, teor de azoto Kjeldhal; MS (%), teor de matéria seca; CE, condutividade elétrica; C/N, relação carbono-azoto. \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01; \*\*\* p ≤ 0,001.

#### Características microbiológicas

No final da compostagem, no composto P2 quantificou-se um maior número de microrganismos, com exceção de actinomicetes, cujo número não diferiu significativamente (p = 0,908) entre os compostos (Quadro 2).

**Quadro 2** - Populações de microrganismos nos compostos no final da compostagem

	Fungos	Bactérias	Actinomicetes	Quitinolíticos
ufc g <sup>-1</sup> composto				
P1	2,27x10 <sup>11</sup> ***	1,60x10 <sup>8</sup> ***	2,40x10 <sup>4</sup>	1,92x10 <sup>4</sup> ***
P2	1,02x10 <sup>12</sup> ***	5,25x10 <sup>11</sup> ***	2,26x10 <sup>4</sup>	1,62x10 <sup>5</sup> ***

P1, composto P1; P2, composto P2; ufc g<sup>-1</sup> composto, unidades formadoras de colónias por grama de composto. \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01; \*\*\* p ≤ 0,001.

O maior teor de matéria orgânica poderá ter favorecido as populações microbianas em P2 (Antil *et al.*, 2015), e em particular os resíduos de cogumelos, ricos em quitina, com um teor médio de 57,75 mg g<sup>-1</sup> (López-Mondéjar *et al.*, 2012). Este fato terá contribuído para a ocorrência de mais microrganismos com capacidade para degradar a quitina, através da quitinase (Sharp, 2013), aumentando a diversidade microbiológica de P2.

Nos dois compostos obtiveram-se 26 isolados com capacidade antagonista, 12 a partir do composto P1 e 14 do composto P2, pertencentes aos géneros *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Purpureocillium*, *Fusarium* e *Bionectria*. Fungos destes géneros ocorrem frequentemente em compostos (Mehta *et al.*, 2014). Recorrendo à análise molecular dos isolados (dados não apresentados), foram identificados os que apresentaram as taxas de inibição mais elevadas nos ensaios *in vitro*, nomeadamente *Trichoderma atroviride* (isolados 1, 2, 3, 5, 6, 9, 22 e 23), *Trichoderma asperellum* (isolado 7), *Fusarium oxysporum* (isolados 14 e 20), *Fusarium keratoplasticum* (isolado 12), *Bionectria ochroleuca* (isolados 18 e 26), já reconhecidos como agentes de controlo biológico (Cotxarrera *et al.* 2002; Benítez *et al.*, 2004; Kaur *et al.*, 2010). Em relação a *F. oxysporum* será ainda necessário avaliar a sua patogenicidade, embora nos ensaios *in vivo* não se tenham observado, nas plantas, sintomas causados por esta espécie, o que sugere tratar-se de uma estirpe não fitopatogénica, que poderá ter efeito benéfico no controlo biológico de outros agentes patogénicos do solo. Com exceção de *F. keratoplasticum*, todos os isolados em P1 foram também identificados em P2. *T. asperellum* e *B. ochroleuca* foram isolados apenas de P2 (Quadro 3).

### Características biológicas

De acordo com Zucconi *et al.* (1985), o índice de germinação de sementes de mastruço, determinado em composto apto para aplicação ao solo deverá ser superior a 65-70 %. Verificou-se que, 77 dias após o início da compostagem, os compostos já apresentavam valores superiores ao intervalo referido. Aos 112 dias, o índice de germinação ultrapassou esses valores, destacando-se o composto P2, com o valor mais elevado (Quadro 4). Este aumento evidencia, neste caso, a importância do grau de maturação do composto e da sua estabilidade biológica (Sullivan e Miller, 2005).

**Quadro 4** - Fitotoxicidade dos compostos orgânicos em plantas da espécie *Lepidium sativum* L. aos 42, 77 e 102 dias de compostagem

	Índice de Zucconi (%)		
	42 dias	77 dias	112 dias
P1	63***	76***	89,9***
P2	28***	68***	94,6***

P1, composto P1; P2, composto P2. \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01; \*\*\* p ≤ 0,001.

### Capacidade antagonista dos isolados *in vitro*

*S. homoeocarpa* apresentou uma taxa de crescimento elevada, atingindo um raio de 58,3 mm, 4 dias após a inoculação (DAI) do meio de cultura, sendo apenas suplantado por três isolados de *T. atroviride*, com um crescimento radial superior a 60 mm, no 4.º DAI. Muitos dos isolados apresentaram taxas de crescimento baixas, com crescimento radial inferior a 17,5 mm no 4.º DAI (Quadro 5), tendo sido identificados neste grupo *Fusarium* spp., *Bionectria ochroleuca*, *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Purpureocillium* spp.

Dos 26 isolados com potencial capacidade antagonista, 13 mostraram taxas de inibição superiores a 50 %, relativamente a *S. homoeocarpa* (Figura 1), sendo 10 provenientes do composto P2 e apenas 3 do composto P1.

O maior conteúdo de quitina do composto P2, terá contribuído para o crescimento de microrganismos com capacidade para degradar esta molécula. Esta característica pode favorecer o controlo do crescimento de fungos patogénicos das plantas, por estes

**Quadro 3** - Identificação e origem dos fungos potencialmente antagonistas existentes nos compostos orgânicos P1 e P2

Espécie	N.º de Isolados	Composto de origem
<i>Trichoderma atroviride</i>	2	P1
<i>Trichoderma atroviride</i>	6	P2
<i>Trichoderma asperellum</i>	1	P2
<i>Fusarium oxysporum</i>	2	P1 e P2
<i>Fusarium keratoplasticum</i>	1	P1
<i>Bionectria ochroleuca</i>	2	P2

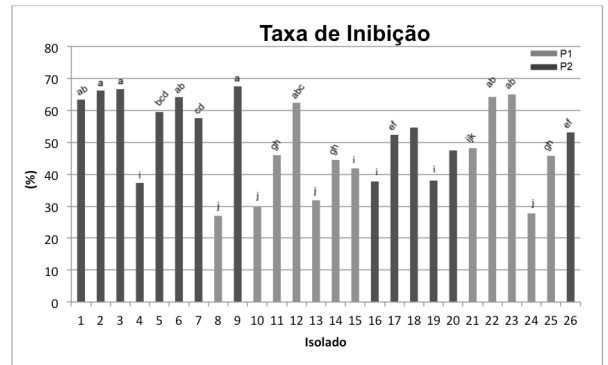
**Quadro 5 -** Crescimento (mm) dos isolados potencialmente antagonistas e do fungo patogênico *Sclerotinia homoeocarpa*

Fungo	DAI 1	DAI 2	DAI 3	DAI 4
1	11,06d	24,64de	41,32b	56,56bc
2	14,20c	28,41cd	40,33b	53,71c
3	20,08a	37,22a	57,76a	63,43a
4	5,73fg	10,02g	13,34de	16,00fg
5	7,26ef	21,25ef	30,42c	43,89d
6	8,20e	18,49f	25,93c	37,23e
7	10,29d	27,97cd	41,0b	55,62bc
8	2,64h	3,43h	5,36g	6,24ij
9	14,45c	34,81ab	53,42a	60,69ab
10	4,91g	6,16gh	7,53fg	9,06ghij
11	3,69gh	5,27gh	7,77fg	12,66fghi
12	4,26gh	7,49gh	14,38d	18,08f
13	4,01gh	6,03gh	6,03fg	6,03j
14	4,98g	6,77gh	9,56defg	11,89ghij
15	5,11g	8,77g	8,78efg	8,77hij
16	4,70gh	7,02gh	7,02fg	7,02hij
17	3,77gh	6,63gh	9,09defg	10,51ghij
18	3,78gh	5,69gh	7,37fg	9,42hij
19	4,96g	8,78g	10,03defg	10,03ghij
20	4,22gh	6,84gh	9,12defg	11,52ghij
21	4,65gh	7,34gh	11,16def	13,21fgh
22	19,80a	36,22a	55,76a	60,43a
23	8,20e	17,49f	23,93c	34,23e
24	4,91g	6,16gh	7,53fg	9,63hij
25	3,46gh	4,82gh	7,72fg	11,28ghij
26	4,21gh	6,17gh	7,72fg	11,28ghij
<i>S. homoeocarpa</i>	16,73b	31,46bc	44,19b	58,26abc

Para cada coluna, os valores seguidos da mesma letra não apresentam diferenças significativas para  $p < 0,05$ . DAI, número de dias após a inoculação.

fungos também apresentarem quitina na sua constituição (Sharp, 2013).

*T. atroviride*, *T. asperellum*, *F. oxysporum*, *F. keratoplasticum*, *B. ochroleuca* provocaram maior inibição do crescimento de *S. homoeocarpa*. *F. oxysporum*,



**Figura 1 -** Taxa de inibição de *Sclerotinia homoeocarpa* no confronto com isolados de fungos presentes nos compostos P1 e P2. Os valores seguidos da mesma letra não apresentam diferenças estatísticas para  $p \leq 0,05$  (teste de Duncan).

*F. keratoplasticum*, *B. ochroleuca*, controlaram o crescimento do patogênico, apesar de terem apresentado taxas de crescimento baixas, na sua presença.

Aos 7 DAI, a interação entre os fungos com potencial antagonista e os agentes patogênicos foi do tipo E, de acordo com Magan e Lacey (1984). A interação do tipo E caracteriza-se pela inibição de uma das espécies em contacto, continuando o antagonista a crescer, a uma taxa mais reduzida, sobre a colónia inibida (a do agente patogênico).

#### Capacidade supressiva dos compostos obtidos para *S. homoeocarpa*, in vivo

Os primeiros sintomas de doença provocada por *S. homoeocarpa* surgiram nas modalidades T, Tt, P1t e P2t, aos 12 DAI (Quadro 6).

**Quadro 6 -** Incidência e Severidade da doença, nas diferentes modalidades, ao longo do ensaio

DAI	Incidência da doença (%)						Severidade da doença					
	T	Tt	P1	P1t	P2	P2t	T	Tt	P1	P1t	P2	P2t
12	15a	45a	5a	30a	0a	30a	0,2a	0,55a	0,05a	0,45a	0a	0,3a
18	35ab	70a	0b	50ab	0b	55a	0,6ab	1,1a	0b	0,55ab	0a	0,65ab
21	85a	100a	15b	70a	0b	70a	1,35a	1,9a	0,15b	1ab	0b	1,6a
27	100a	100a	35b	85a	20b	100a	1,8bc	2,1ab	0,35d	1,25c	0,5d	2,65a
34	100a	100a	60b	100a	40c	100a	2,3ab	3,1a	0,7c	1,7bc	0,9c	3,0a
41	100a	100a	70b	100a	55b	100a	4,7a	4,15ab	1,10d	2,3c	1,15d	3,55b
49	100a	100a	75b	100a	70b	100a	5,0a	4,6ab	1,65d	3,35c	1,4d	3,9bc
55	100a	100a	80b	100a	70b	100a	5,0a	4,75ab	2,15d	4,05c	1,4e	4,3bc

Para cada parâmetro analisado, em cada linha (DAI), os valores seguidos da mesma letra não apresentam diferenças significativas, para  $p < 0,05$ . DAI, número de dias após a inoculação, P1, composto P1; P1t, composto P1 tratado termicamente; P2, composto P2; P2t, composto P

Analisando a Severidade da doença, verificou-se que o fungo se desenvolveu mais rapidamente nos compostos tratados termicamente e na turfa (tratada e não tratada) (Quadro 6). Estas modalidades favoreceram também o crescimento de *S. homoeocarpa* com o consequente aumento da área das manchas na relva. A menor diversidade microbiológica nas modalidades T, Tt, P1t e P2t terá favorecido o crescimento do patogénico, tal como verificado por outros autores (Cotxarrera *et al.*, 2002; Trillas *et al.*, 2006; Reis e Coelho, 2013).

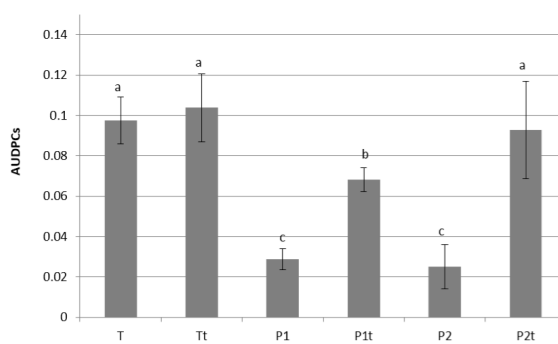
No final do ensaio (55 DAI) as modalidades P1 e P2 apresentaram maior capacidade supressiva para *S. homoeocarpa*, observando-se menor Incidência e Severidade da doença, em comparação com as restantes modalidades que, tal como esperado, apresentaram uma Incidência da doença de 100 % em T, Tt, P1t e P2t (Quadro 6). Na turfa (55 DAI) a área afetada pela doença foi de 95,2 % e de 90,6 %, respetivamente na turfa não tratada e tratada termicamente, o que é significativamente superior ( $p < 0,05$ ) ao verificado em P1 e P2, onde essa área foi apenas de 19,1 % e 10,8 %, respetivamente. Assim, a severidade da doença, no final do ensaio, foi mais elevada em T e Tt, embora em Tt não tenha diferido significativamente de P2t, que por sua vez, também não diferiu de P1t (Quadro 6). A superioridade da capacidade supressiva das modalidades P1 e P2 destacou-se significativamente das restantes.

No final do ensaio, a capacidade dos compostos P1 e P2 para suprimirem as doenças pode atribuir-se aos microrganismos presentes, com populações mais elevadas de *Trichoderma* spp., e mais baixas de *Sclerotinia* spp. (Quadro 7). A presença de *T. gamsii* e a sua ação antagonista contra *S. homoeocarpa*, em solos com relvados, já tinha sido observada por Coelho *et al.* (2016). Em estudos com *T. harzianum*, Guerrero *et al.*

(2008) constataram igualmente a sua capacidade de controlo de doenças do solo em relvados.

As características físico-químicas dos compostos também podem ter influência no controlo biológico (Walsh *et al.*, 1999; Cotxarrera *et al.*, 2002; Pane *et al.*, 2011), embora isso não tenha sido evidente no presente estudo, quando se compara a severidade da doença em P1t, P2t e Tt. De fato, não se verificaram diferenças significativas entre modalidades no final do ensaio quanto a CE, e o tratamento térmico não alterou o pH dos substratos destas modalidades (Quadro 7).

A variável AUDPC, que indica a progressão da doença foi mais elevada em T, Tt e P2t, que não diferiram significativamente entre si ( $p < 0,05$ ), seguindo-se a observada na modalidade P1t (Figura 2). A progressão da doença foi significativamente menor nas modalidades P1 e P2, compostos não sujeitos a tratamento térmico, o que indicia a natureza microbiológica da supressividade ocorrida.



**Figura 2** - Área sob a curva de progresso da doença (AUDPC) para cada substrato. Os valores seguidos da mesma letra não apresentam diferenças estatísticas para  $p \leq 0,05$  (teste de Duncan). P1, composto P1; P1t, composto P1 tratado termicamente; P2, composto P2; P2t, composto P2 tratado termicamente, T, turfa; Tt, turfa tratada termicamente.

**Quadro 7** - pH, condutividade elétrica e populações microbianas no final do ensaio (ufc. g<sup>-1</sup> de substrato)

	T	Tt	P1	P1t	P2	P2t
pH	4,49b	3,87c	6,80a	6,98a	6,95a	7,22a
CE (dS m <sup>-1</sup> )	0,123a	0,155a	0,215a	0,403a	0,330a	0,390a
<i>Trichoderma</i> spp.	1,66x10 <sup>3b</sup>	32,5c	8,67x10 <sup>3a</sup>	1,65x10 <sup>3b</sup>	9,18x10 <sup>3a</sup>	5,17x10 <sup>2c</sup>
<i>Sclerotinia</i> spp.	1,34x10 <sup>3c</sup>	2,16x10 <sup>3b</sup>	1,05x10 <sup>3c</sup>	4,04x10 <sup>3a</sup>	2,47x10 <sup>3d</sup>	1,01x10 <sup>3c</sup>

Para cada linha, valores seguidos da mesma letra não apresentam diferenças significativas, para  $p < 0,05$ . P1, composto P1; P1t, composto P1 tratado termicamente; P2, composto P2; P2t, composto P2 tratado termicamente, T, turfa; Tt, turfa tratada termicamente.

## CONCLUSÕES

A compostagem dos resíduos agroindustriais descritos permitiu a obtenção de dois compostos orgânicos com boa qualidade agronômica, dos quais foram isolados fungos com capacidade para suprimir o crescimento de *S. homoeocarpa*. Nos ensaios *in vitro*, verificou-se que o maior número de fungos com capacidade supressiva para *S. homoeocarpa* foi isolado do composto P2. Nos testes *in vivo*, ambos os compostos apresentaram capacidade para controlar o desenvolvimento de *S. homoeocarpa* e a manifestação de doença na relva (*Agrostis stolonifera*), em particular o composto P2. A presença de resíduos ricos em quitina na

mistura compostada poderá ter contribuído para os melhores resultados obtidos em P2. No entanto, será necessário confirmar o efeito dos resíduos com quitina no aumento da supressividade do composto orgânico P2.

## AGRADECIMENTOS

Trabalho apoiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia através de uma bolsa de doutoramento para Luísa Coelho (SFRH/BD/109218/2015). Os autores agradecem à Universidade de Sevilha a cedência de *S. homoeocarpa*, particularmente ao Dr. Manuel Avilés.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfano, G.; Lustrato, G.; Lima, G.; Vitullo, D. & Ranalli, G. (2011) – Characterization of composted olive mill wastes to predict potential plant disease suppressiveness. *Biological Control*, vol. 58, n. 3, p. 199-207. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.05.001>
- Antil, R.S.; Raj, D.; Adballa, N. & Inubushi, K. (2015) – Physical, Chemical and Biological parameters for Compost Maturity Assessment: A Review. In: Maheshwari, D.K. (Ed.) – *Composting for Sustainable Agriculture*. London, Springer, p. 283.
- Baayen, R.P. & Van der Plas, C.H. (1992) – Localization ability, latent period and wilting rate in eleven carnation cultivars with partial resistance to Fusarium wilt. *Euphytica*, vol. 59, n. 2-3, p. 165-174. <https://doi.org/10.1007/BF00041269>
- Barker, A.V. (2001) – Compost utilization in sod production and turf management. In: Stoffella, P.J. & Kahn, B.A. (Eds.) – *Compost utilization in horticultural cropping systems*. Boca Raton, Lewis Publications, p. 201-225.
- Batista, J.G.F. & Batista, E.R.B. (2007) – *Compostagem – Utilização de compostos em Horticultura*. Angra do Heroísmo, Universidade dos Açores – CITA-A, 252 p.
- Benítez, T.; Rincón, A.M.; Limón, M.C. & Codón, A.C. (2004) – Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains. *International Microbiology*, vol. 7, n. 4, p. 249-260.
- Berjón, M.A.; Murray, P.N. & Benedito, C.C. (2004) – Los sustratos en los cultivos sin suelo. In: Gavilán, M.U. (Ed.) – *Tratado de Cultivo Sin Suelo*. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa, p. 113-158.
- Brinton, W. (2000) – *Compost quality standards & guidelines – Final Report*. Woods End Research Laboratory, Inc. [cit. 2019.01.08]. <http://compost.css.cornell.edu/Brinton.pdf>
- Chung, Y. R. & Hoitink, H.A.J. (1990) – Interactions Between Thermophilic Fungi and Trichoderma hamatum in Suppression of Rhizoctonia Damping-Off in a Bark Compost – Amended Container Medium. *Phytopathology*, vol. 80, n. 1, p. 73-77. <https://doi.org/10.1094/Phyto-80-73>
- Coelho, L.; Dionísio, L.; Bueno, F.; Reis, M.; Duarte, J. & Guerrero, C. (2016) – *Trichoderma gamsii* as a biological control agent of turfgrass diseases. In: *Book of Abstracts of the 5<sup>th</sup> European Turfgrass Society Conference – Turfgrass – Towards Sustainability and Perfection for Aesthetic, recreational and Sports*. Albufeira, Portugal, p. 145-146.
- Cotxarrera, L.; Trillas-Gay, M. I.; Steinberg, C. & Alabouvette, C. (2002) – Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress Fusarium wilt of tomato. *Soil Biology & Biochemistry*, vol 34, p. 467-476. [http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00205-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00205-X)
- Day, M. & Shaw, K. (2005) – Processos Biológicos, químicos, físicos del compostaje. In: Stollella, P. & Kahn, B. (Eds.) – *Utilización de compost en sistemas de cultivo hortícola*. Ediciones Mundi-Prensa. p. 17-50.
- Ferreira, J.; Conceição, J.; Strecht, A.; Ribeiro, J.; Soeiro, A. & Cotrim, G. (2002) – *Manual de agricultura biológica – Fertilização e protecção das plantas para uma agricultura sustentável*. 3.<sup>a</sup> ed, Lisboa, Agrobio, 435 p.



- Field, A. (2009) – *Discovering Statistics using SPSS*. 3<sup>rd</sup> ed, London, SAGE Publication. ISBN 978-1-84787-906-6
- Guerrero, C.; Vitoriano, J.; Neto, L. & Dionísio, L. (2008) – Control of fungi diseases on turfgrass using *Trichoderma harzianum*. *WSEAS Transactions on Environment and Development*, vol. 9, p.736-745.
- Hoitink, H.A.J.; Stone, A.G. & Han, D.Y. (1997) – Suppression of plant disease by composts. *HortScience*, vol. 32, p. 184-187.
- Kaur, R.; Kaur, J. & Singh, R. (2010) – Nonpathogenic *Fusarium* as a Biological Control Agent. *Plant Pathology Journal*, vol. 9, n. 3, p. 79-91. <http://dx.doi.org/10.3923/ppj.2010.79.91>
- López-Mondéjar, R.; Blaya, J.; Obiol, M.; Ros, M. & Pascual, J.A. (2012) – Evaluation of the effect of chitin-rich residues on the chitinolytic activity of *Trichoderma harzianum*: *In vitro* and greenhouse nursery experiments. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 103, n. 1, p. 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.02.001>
- Magan, N. & Lacey, J. (1984) – Effect of water activity, temperature and substrate on interaction between field and storage fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, vol. 82, n. 1, p. 83-93. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(84\)80214-4](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(84)80214-4)
- Martínez, F.X. (1992) – Propuesta de metodología para la determinación de las propiedades físicas de los substratos. *In: Actas de las I Jornadas de Substratos de la SECH*, p.55-65.
- Mehta, C.M.; Palni, U.; Franke-Whittle, I.H. & Sharma, A.K. (2014) – Compost: Its role, mechanism and impact on reducing soil-borne plant diseases. *Waste Management*, vol. 34, n. 3, p. 607-622. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.11.012>
- Pane, C.; Spaccini, R.; Piccolo, A.; Scala, F.; & Bonanomi, G. (2011) – Compost amendments enhance peat suppressiveness to *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia minor*. *Biological Control*, vol. 56, n. 2, p. 115-124. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.10.002>
- Pane, C. & Zaccardelli, M. (2014) – Principles of Compost-based Plant Diseases Control and innovative new developments. *In: Maheshwari D.K. (Ed.) – Composting for sustainable agriculture*. London, Springer, London, p.151-171.
- Ramos, J.C.M.; Vilaseca, J.S.; Ramon, A.C. (1987) – Control analític de la qualitat del compost i estudi de la seva maduració. *In: Experiències amb el compost. Estudis I monografies*, nº 12, p. 31-69. Server del Medi Ambient, Diputació de Barcelona.
- Reis, M. (2016) – Os compostos no controlo de doenças das plantas. *Revista de Ciências Agrárias*, vol. 39, n. 1, p. 25-35. <http://dx.doi.org/10.19084/RCA15111>
- Sant, D.; Casanova, E.; Segarra, G.; Avilés, M.; Reis, M. & Trillas, M. I. (2010) – Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 on *Fusarium* wilt and water usage in carnation grown on compost-based growth medium. *Biological Control*, vol. 53, n. 3, p. 291-296. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.01.012>
- Sharp, R.G. (2013) – A Review of the Applications of Chitin and Its Derivatives in Agriculture to Modify Plant-Microbial Interactions and Improve Crop Yields. *Agronomy*, vol. 3, n. 4, p. 757-793. <http://dx.doi.org/10.3390/agronomy3040757>
- Sullivan, D.M. & Miller, R.O. (2005) – Propiedades cualitativas, medición y varibilidad de los compost. *In: Stollella, P. & Kahn, B. (Eds.) – Utilización de compost en sistemas de cultivo hortícola*. Ediciones Mundi-Prensa, p. 95-119.
- Steadman, J.R.; Marcinkowska, J. & Rutledge, S. (1994) – A Semi-Selective Medium for Isolation of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, vol. 16, n. 1, p. 68-70. <https://doi.org/10.1080/07060669409500791>
- Trillas, M.I.; Casanova, E.; Cotxarrera, L.; Ordovás, J.; Borrero, C. & Avilés, M. (2006) – Composts from agricultural waste and *Trichoderma asperellum* strain T-34 suppress *Rhizoctonia solani* in cucumber seedlings. *Biological Control*, vol. 39, p. 32-38. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.05.007>
- Walsh, B.; Ikeda, S.S. & Boland, G. (1999) – Biology and Management of Dollar Spot (*Sclerotinia homoeocarpa*); an Important Disease of Turfgrass. *HortScience*, vol. 34, n. 1, p.13-21.
- White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S. & Taylor J. (1990) – Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: Sninsky, J.J. & White, T.J. (Eds.) -PCR protocols: A guide to methods and applications*. New York, New York, Academic Press, p.315-322.
- Zucconi, F.; Mónaco, A. & Forte, M. (1985) – Phytotoxins during the stabilization of organic matter. *In: Gasser, J.K.R. (Ed.) – Composting of agricultural and other wastes*. London, pp. 73-85. Elsevier Applied Science Publishers.