

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**CONTROLE BIOLÓGICO DO MOFO CINZENTO (*Botrytis cinerea*) COM
Clonostachys rosea EM CULTIVOS EXPERIMENTAL E COMERCIAL DE
MUDAS DE FÚCSIA**

**Ana Elisa Silvera-Pérez
Engenheira Agrônoma/UdelaR**

**Dissertação apresentada com um dos
requisitos à obtenção do Grau de
Mestre em Fitotecnia
Área de Concentração Fitossanidade**

Porto Alegre (RS), Brasil
Janeiro, 2006

HOMOLOGAÇÃO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela graça de sua presença em minha vida, ajudando-me a transitar os caminhos que vou percorrendo.

A meus pais, Genaro e Elvira; meus irmãos Gabriela, Martín, Adriana e Juan Ramón; meus cunhados Julio; Judith e Jarwin; meus sobrinhos Matilde, Gonzalo, Carolina e María Julia e a toda minha família, pelo carinho e apoio.

À Faculdade de Agronomia da Universidade da República do Uruguai pela liberação para realizar o Curso de Mestrado.

À Faculdade de Agronomia da Universidade de Rio Grande do Sul pela oportunidade da realização do Curso de Mestrado.

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), pela oportunidade da realização do trabalho de Mestrado.

Ao Prof. Valmir Duarte, pela amizade, ensinamento, orientação e incentivo a superar-me durante todas as etapas do Curso.

À Dra. Rosa María Veldebenito-Sanhueza, pela amizade ensinamento, orientação e a oportunidade de ter-me facilitado conhecer outras realidades acadêmicas e de pesquisa.

À empresa Agro-Industrial Lazzeri Ltda., pelo apoio, em especial aos Engenheiros Agrônomos Hércio Eloi Koefender, Jadir Swirtes e Fernando Leichtweis e demais funcionários por viabilizar e apoiar a condução do trabalho.

Aos Professores da banca Aida T. S. Matsumura, Miguel D. M. Porto e Elena Blume, pelas correções e sugestões na dissertação.

Aos integrantes do Laboratório de Fisiologia Vegetal da EMBRAPA Uva e Vinho, Dr. Henrique P. dos Santos e João Felipeto, pela realização da medição de fotossíntese.

Aos integrantes do Laboratório de Controle Biológico da EMBRAPA Recursos Genéticos, em especial à Dra. Maria C. Valadares-Ingliš, Dr. Peter Ingliš, Rúbia Borges, Camila C. Gavião e M.Sc. José E. Menezes, pela supervisão e colaboração na análise molecular.

Aos integrantes dos Laboratórios de Clínica Vegetal e Bacteriologia Vegetal, em especial à Marisa Dalbosco, Larissa B. Gomes, Valmor S. Santos, Miguel O. B. Rodrigues e Amauri C. Pivotto, pela colaboração no trabalho.

Aos funcionários da Estação Experimental de Fruticultura Temperada do CNPUV, em especial a Nereu Vanin de Melo, Zélia Cardoso e Jôse Krasniak, pelo apoio no trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia, em especial Marise Macedo e Júlia M. Fernandes, pelo apoio.

Aos meus colegas e amigos da Unidade de Fitopatologia da Faculdade de Agronomia da Universidade da República, pelo apoio recebido que possibilitou concretizar meus estudos.

As amigas Rachel R. da Silva, Rossana D. Tasso, Adriana R. Corrent, Cátia C. Rommel, Márcia Ruff, pelo carinho e apoio.

Aos amigos Célica Figueredo, Ana M. Ramírez, Pedro Mondino e Silvana Vero, pela constante presença e apoio.

CONTROLE BIOLÓGICO DO MOFO CINZENTO (*Botrytis cinerea*) COM *Clonostachys rosea* EM CULTIVOS EXPERIMENTAL E COMERCIAL DE MUDAS DE FÚCSIA¹

Autora: Ana Elisa Silvera-Pérez

Orientador: Valmir Duarte

Co-Orientadora: Rosa Maria Valdebenito-Sanhueza

RESUMO

O cultivo de mudas de fúcsia (*Fuchsia speciosa*) pode sofrer perdas por Mofo Cinzento (MC), causado por *Botrytis cinerea*. Relatos indicam que *Clonostachys rosea* é um fungo eficaz no controle do MC em diferentes hospedeiros. Esta pesquisa objetivou definir a eficácia do congelamento como método alternativo ao meio de cultivo com paraquat para a detecção de infecções latentes de *B. cinerea* em tecidos de fúcsia; comparar a eficácia de três estirpes de *C. rosea* no controle do MC em cultivo experimental de fúcsia; comparar o desempenho de *C. rosea* aos fungicidas na incidência/severidade do MC, na fotossíntese e na produção de mudas no cultivo comercial. Nos resultados verificou-se que o tratamento de folhas destacadas com temperatura -20 °C por 15 e 20 min mostrou efeito semelhante à incubação em meio ágar-paraquat na detecção de *B. cinerea*. No experimento conduzido em 2004 e 2005 em estufa em Porto Alegre, RS, a eficiência das estirpes GFO4, G8 e GSAL de *C. rosea* no controle do MC foi comparada avaliando-se folhas de fúcsia destacadas. As três estirpes do antagonista não diferiram na redução da incidência do MC. No experimento conduzido nestes dois anos, em estufa com cultivo comercial de mudas em Vacaria, RS, as plantas foram aspergidas: (1) semanalmente com água + espalhante adesivo (0,01%); (2) aplicação seqüencial de fungicidas (clorotalonil, folpet, oxicloreto de cobre, mancozeb, iprodione e thiram); (3) suspensão de conídios da estirpe GFO4, 39 vezes a partir dos 26 dias do transplantio; e (4) suspensão de GFO4, 29 vezes a partir dos 61 dias do transplantio. *C. rosea* reduziu a incidência/severidade do MC a níveis similares das plantas tratadas com fungicida nos dois anos, sem afetar a fotossíntese ou o número de mudas. As aplicações com *C. rosea* podem ser iniciadas no segundo mês pós o transplantio.

¹ Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (92 p.). Janeiro, 2006.

BIOLOGICAL CONTROL OF GRAY MOLD (*Botrytis cinerea*) WITH *Clonostachys rosea* IN EXPERIMENTAL AND COMMERCIAL GROWTH OF FUCHSIA¹

Author: Ana Elisa Silvera-Pérez

Adviser: Valmir Duarte

Co-Adviser: Rosa Maria Valdebenito-Sanhueza

ABSTRACT

Gray Mold (GM), caused by *Botrytis cinerea*, may induce heavy losses to the production of fuchsia cuttings. The effectiveness of *Clonostachys rosea* in the control of GM on several plants is well-known. This research aimed to define the efficiency of leaf freezing for the detection of latent infections of *B. cinerea*; to compare three strains of *C. rosea* in the control of GM on fuchsia experimental growth; to compare *C. rosea* to usually applied fungicides on a commercial growth on the incidence and severity of GM, the photosynthesis and the production of cuttings. In a preliminary study, the method of detecting *B. cinerea* by submitting detached leaves to -20 °C for 15 and 20 min showed similar results to the incubation on agar-paraquat medium, and was adopted to evaluate the amount of GM. In a greenhouse experiment in 2004 and 2005, Porto Alegre, RS, the efficiency of three strains of *C. rosea* was compared using detached leaves of fuchsia. The GFO4, G8 and GSAL strains showed the same performance in preventing and reducing the incidence of GM. In another experiment conducted in these two years in a commercial greenhouse, Vacaria, RS, plants of fuchsia var. 022, from cuttings, were sprayed with: (1) water + wetting agent, 0.01% (control); (2) fungicides (chlorotalonil, folpet, copper, mancozeb, iprodione or thiram), applied weekly, alternating the active ingredients; (3) 39 applications 26 days after transplanting, conidial suspension of strain GFO4 of *C. rosea*, and (4) 29 application after 61 days of the transplanting. Conidial suspension of GFO4 of *C. rosea* reduced the incidence and severity of GM to similar levels of the fungicide-treated plants in both years, without difference in the photosynthesis and numbers of cuttings. The disease amount did not change when the treatment with *C. rosea* started two months after transplanting.

¹ Master of Science Dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (92 p.). January, 2006.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| CAPITULO I | |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 4 |
| 2.1. Importância da floricultura..... | 4 |
| 2.2. A produção de mudas de fúcsia..... | 5 |
| 2.3. O Mofo Cinzento..... | 6 |
| 2.4. O fungo <i>Clonostachys rosea</i> | 10 |
| 2.5. Doenças controladas por <i>Clonostachys rosea</i> | 16 |
| 2.6. Controle do Mofo Cinzento com <i>Clonostachys rosea</i> | 18 |
| 2.7. Variáveis da efetividade de <i>Clonostachys rosea</i> | 20 |
| 2.8. Mecanismos de ação de <i>Clonostachys rosea</i> | 24 |
| 2.9. Método de avaliação do parasitismo por <i>Clonostachys rosea</i> | 27 |
| CAPITULO II | |
| 3. CONGELAMENTO DE BROTOS E FOLHAS DE FÚCSIA COMO ALTERNATIVA AO USO DE PARAQUAT NA DETECÇÃO DE INFECÇÃO LATENTE DE <i>Botrytis cinerea</i> | 29 |
| 3.1. Introdução..... | 29 |
| 3.2. Material e métodos..... | 32 |
| 3.3. Resultados e discussão..... | 33 |
| CAPITULO III | |
| 4. APLICAÇÃO PREVENTIVA E CURATIVA DE <i>Clonostachys rosea</i> EM FOLHAS DESTACADAS DE FÚCSIA PARA O CONTROLE DO MOFO CINZENTO..... | 36 |
| 4.1. Introdução..... | 36 |
| 4.2. Material e métodos..... | 39 |
| 4.3. Resultados e discussão..... | 41 |

CAPÍTULO IV

| | |
|--|----|
| 5. CONTROLE BIOLÓGICO DO MOFO CINZENTO (<i>Botrytis cinerea</i>) COM <i>Clonostachys rosea</i> EM CULTIVOS EXPERIMENTAL E COMERCIAL DE MUDAS DE FÚCSIA..... | 45 |
| 5.1. Introdução..... | 45 |
| 5.2. Material e métodos..... | 48 |
| 5.2.1. Descrição do local do ensaio..... | 48 |
| 5.2.2. Obtenção das estirpes de <i>Clonostachys rosea</i> | 49 |
| 5.2.3. Produção do inóculo de <i>Clonostachys rosea</i> | 49 |
| 5.2.4. Obtenção do isolado e produção do inóculo de <i>Botrytis cinerea</i> | 50 |
| 5.2.5. Experimento 1: Comparação do biocontrole do Mofo Cinzento exercido por três estirpes de <i>Clonostachys rosea</i> | 51 |
| 5.2.6. Experimento 2: Avaliação do biocontrole do Mofo Cinzento com a estirpe GFO4 de <i>Clonostachys rosea</i> no cultivo comercial de mudas de fúcsia cv. 022..... | 52 |
| 5.2.7. Avaliação dos experimentos..... | 55 |
| 5.3. Resultados e discussão..... | 61 |
| 5.3.1. Comparação do biocontrole do Mofo Cinzento exercido por três estirpes de <i>Clonostachys rosea</i> | 61 |
| 5.3.2. Avaliação do biocontrole do Mofo Cinzento com a estirpe GFO4 de <i>Clonostachys rosea</i> no cultivo comercial de mudas de fúcsia cv. 022..... | 66 |
| 5.3.3. Produção de muda por planta e medição da fotossíntese..... | 72 |
| 5.3.4. Análise molecular de isolados de <i>Clonostachys rosea</i> obtidos em disco de folhas no experimento comercial..... | 77 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 80 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 81 |

RELAÇÃO DE TABELAS

Página

CAPITULO IV

| | |
|--|----|
| 1. Incidência de <i>Botrytis cinerea</i> em discos de folhas de plantas de fúcsia tratadas com água, estirpe GFO4 de <i>Clonostachys rosea</i> e fungicidas. Vacaria, 2004..... | 70 |
| 2. Severidade de <i>Botrytis cinerea</i> em discos de folhas de plantas de fúcsia tratadas com água, estirpe GFO4 de <i>Clonostachys rosea</i> e fungicidas. Vacaria, 2004..... | 71 |
| 3. Incidência e severidade de <i>Botrytis cinerea</i> em discos de folhas de plantas de fúcsia tratadas com água, estirpe GFO4 de <i>Clonostachys rosea</i> e fungicidas. Vacaria, 2005..... | 71 |
| 4. Incidência de <i>Clonostachys rosea</i> em discos de folhas de plantas de fúcsia tratadas com água, estirpe GFO4 de <i>Clonostachys rosea</i> e fungicidas. Vacaria, 2004, 2005..... | 72 |

RELAÇÃO DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| CAPITULO I | |
| 1. Vista da planta de fúcsia cv. 022, Vacaria, RS..... | 6 |
| CAPITULO II | |
| 2. Incidência de <i>Botrytis cinerea</i> em discos de folhas de fúcsia..... | 35 |
| 3. Incidência de <i>Botrytis cinerea</i> em brotos de fúcsia..... | 35 |
| CAPITULO III | |
| 4. Incidência de <i>Botrytis cinerea</i> em discos de folhas de fúcsia..... | 44 |
| 5. Incidência de <i>Clonostachys rosea</i> em discos de folhas de fúcsia..... | 44 |
| CAPITULO IV | |
| 6. Colônias puras das estirpes GSAL (A), GFO4 (B) e G8 (C) de <i>Clonostachys rosea</i> , em placas de petri com batata-dextrose-agar, isoladas de folhas de morangueiro da coleção EMBRAPA-CNPUV..... | 49 |
| 7. Vistas das plantas de fúcsia cv. 022, no experimento 1, Departamento Fitossanidade, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS..... | 52 |
| 8. Vistas das plantas de fúcsia cv. 022, experimento 2, Empresa Agro-Industrial Lazzeri Ltda., Vacaria, RS..... | 54 |
| 9. Barreira para evitar deriva dos produtos no momento da aplicação, Vacaria, RS..... | 54 |
| 10. Divisão do disco de folha de fúcsia para o cálculo da área colonizada por <i>Botrytis cinerea</i> | 56 |
| 11. Incidência de <i>Botrytis cinerea</i> em discos de folhas de fúcsia..... | 64 |
| 12. Incidência de <i>Clonostachys rosea</i> em discos de folhas de fúcsia..... | 64 |

| | Página |
|--|--------|
| 13. Temperatura média no período julho a dezembro. Porto Alegre, 2004..... | 65 |
| 14. Temperatura média no período julho a dezembro. Porto Alegre, 2005..... | 65 |
| 15. Número de mudas de fúcsia por planta..... | 74 |
| 16. Fotossíntese líquida em plantas de fúcsia aos 298 (2004) e 277 dias pós-transplântio (2005)..... | 74 |
| 17. Plantas de fúcsia cv. 022 dos tratamento: (1) testemunha; (2) fungicidas; (3) 39 aplicações com GFO4; (4) 29 aplicações com GFO4. Vacaria, 2005..... | 76 |
| 18. Produtos amplificados com oligonucleotídeo iniciador randômico das estirpes <i>Clonostachys rosea</i> | 78 |
| 19. Produtos amplificados com oligonucleotídeo iniciador intron (LA1) das estirpes <i>Clonostachys rosea</i> | 78 |

1. INTRODUÇÃO

O Mofo Cinzento (MC), causado pelo fungo *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr., é amplamente distribuído no mundo, afetando várias espécies de plantas, entre elas as ornamentais, particularmente em sistemas protegidos. A produção de mudas de fúcsia (*Fuchsia speciosa* Hort.) pode sofrer grandes perdas por MC dependendo da variedade e das condições do ambiente. Os sintomas do MC em fúcsia consistem em manchas foliares, requeima das folhas e flores, morte de mudas, cancrios e podridões de ramos e até a morte das plantas (Huelsman, 2004).

O fungo *B. cinerea* pode produzir infecções quiescentes (latentes), onde o fungo consegue penetrar, mas não se desenvolve dentro do tecido da planta porque as condições do ambiente ou estado fisiológicos do hospedeiro não são propícias para seu crescimento. Essas infecções não têm sido evidenciadas em tecidos de fúcsia, mas são descritas em folhas novas de morangueiro onde *B. cinerea* permanece latente nas células da epiderme até as folhas senescerem.

Entre os métodos para a detecção de infecções latentes de *B. cinerea* o meio de cultura composto por paraquat-cloranfenicol-ágar (PCA) tem sido amplamente empregado. No entanto, o paraquat é um herbicida altamente tóxico o que recomenda a substituição deste método. O método de

congelamento dos tecidos de plantas tem sido usado como alternativa ao PCA, sendo efetivo na indução da esporulação de infecções latentes de *B. cinerea* em folhas de morangueiro, framboeseiro e amoreira.

A aplicação dos fungicidas sintéticos tem sido a principal forma de combater o MC nos cultivos protegidos. Contudo o uso contínuo de fungicidas estimula a seleção de estirpes resistentes, constitui-se em risco à saúde dos trabalhadores que tem atividades no ambiente fechado de casa vegetação onde podem ser expostos aos efeitos desses produtos. Os exportadores de flores sofrem ainda de uma limitação adicional que são as regulamentações nos países da Europa, exigindo produtos com níveis mínimos de resíduos.

Uma alternativa ao controle químico dos patógenos da parte aérea das plantas é o controle biológico. Fungos e bactérias têm sido relatados no controle destas doenças de plantas. Assim, aplicações foliares de *Clonostachys rosea* (Link: Fr.) Schroers, Samuels, Seifert & W. Gams têm sido efetivas na supressão da esporulação de *B. cinerea* em numerosos hospedeiros tais como morangueiro (*Fragaria vesca* L.), videira (*Vitis vinifera* L.), framboeseiro (*Rubus idaeus* L.), amoreira (*Rubus americanus* Focke), florestais e ornamentais.

No Brasil, suspensões de esporos de *C. rosea* aplicadas semanalmente em morangueiros cultivados em casa de vegetação e em folhas destacadas de morangueiros, framboeseiro, e amoreira controlaram eficientemente o MC. A maior dificuldade do uso do controle biológico no manejo de doenças de plantas se deve a que vários resultados foram obtidos em condições de laboratório e experimental e muito pouco em condições de cultivo comercial, traduzindo-se em falta de consistência nos resultados de

biocontrole.

Assim, este trabalho teve como objetivos: a) definir a eficácia do congelamento como método alternativo ao meio de cultivo com paraquat para a detecção de infecções latentes de *B. cinerea* em folhas de fúcsia; b) comparar três estirpes de *C. rosea* no controle do MC em cultivo experimental de fúcsia; c) testar no cultivo comercial de mudas de fúcsia em sistema protegido, o desempenho da proteção química e da estirpe GFO4 de *C. rosea* utilizada em dois sistemas de pulverização na incidência e severidade do MC, na fotossíntese e na produção de mudas.

CAPÍTULO I

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância da floricultura

A produção de flores no Brasil, segundo os levantamentos preliminares do Instituto Brasileiro de Floricultura (IBRAFLOR), tem apresentado um importante desenvolvimento, com mais de cinco mil hectares cultivados por aproximadamente quatro mil produtores. A maior parte da produção destina-se ao mercado interno, com vendas que correspondem a US\$ 750 milhões, mas o mercado externo vem expandindo, com vendas, nos primeiros seis meses de 2004, de US\$ 11,7 milhões, 30% mais do que no mesmo período de 2003. (Trindade, 2004).

Dentro do setor agro-exportador de flores e plantas, os maiores valores exportados têm sido obtidos pelo segmento de mudas de plantas ornamentais. No primeiro semestre do 2004, acumulou vendas na ordem de US\$ 6,53 milhões, representando 55,8% do valor total exportado pelo País. As mudas exportadas são originárias, principalmente, do Estado de São Paulo, que responde por 82,5% das vendas internacionais no segmento, seguido pelo Estado do Rio Grande do Sul (RS), com 13,4% (Junqueira & Da Silva, 2004).

A produção anual de mudas, em uma das principais empresas do RS, atinge valores de sete milhões, e as mudas de fúcsia representam 8% da

produção, sendo o mercado italiano o principal destino (Empresa Agro-Industrial LAZZERI Ltda., informação verbal, 2004).

2.2 A produção de mudas *Fuchsia speciosa*

A planta *Fuchsia speciosa* ou *Fuchsia hybrida* Hort., com nome comum de brinco-de-princesa, lágrima ou fúcsia (Figura 1), pertence à divisão Angiospermae, ordem Mirtales família Onagraceae. A espécie é uma planta herbácea de 1-2 m de altura, obtida por hibridização e melhoramento das espécies sul-americanas de *F. fulgens* Moc. et Ses., *F. magellanica* Lam. e *F. corymbiflora* Ruis. et Pav., principalmente. As flores são pendentes, aparecem em pares de cada áxila da folha, com cálice tubular com divisões roxas, vermelhas ou brancas e corola roxa, vermelha, branca ou azul, simples ou dobradas, formadas na primavera e verão (Lorenzi & de Souza, 1999; Polomski, 2004).

A fúcsia é propagada por estacas provenientes de plantas matrizes. As estacas são colocadas para enraizar num meio de crescimento úmido e bem drenado, com pH entre 6,0-6,5, mantidas entre 20-22 °C, a umidade relativa próxima de saturação, durante três semanas. As estacas enraizadas são transplantadas a vasos contendo substrato composto de matéria orgânica (composto de casca de pinus) e inorgânica (areia, perlita ou vermiculita lavada) (Huelsman, 2004).

Da mesma forma que com as demais plantas ornamentais, as doenças são um componente crítico da produção de fúcsia, com destaque para o Mofo Cinzento (MC) (Huelsman, 2004).



FIGURA 1. Vista da planta de fúcsia cv. 022, Vacaria, RS.

2.3 Mofo Cinzento

O Mofo Cinzento (MC), causado pelo fungo *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr., anamorfo do ascomiceto *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel, e favorecido por condições de alta umidade relativa (>90%), água livre na superfície das plantas, temperaturas amenas (15-25 °C), baixa intensidade de luz e disponibilidade de tecidos senescentes e com ferimentos (Hausbeck & Moorman, 1996; Agrios, 2004). Esta doença encontra-se amplamente distribuída no mundo, ocorrendo em várias espécies vegetais, causando perdas na produção em ornamentais, olerícolas, florestais, afetando todos os estádios de desenvolvimento em todas as condições de cultivo, mas mais pronunciadamente nos sistemas protegidos (Morandi, 2001).

Os sintomas de MC descritos em fúcsia são requieima das folhas e flores, cancos e podridões de ramos, manchas foliares e morte de mudas,

(Huelsman, 2004). A doença produz perdas graves na produção em fúcsia (*Fuchsia speciosa*), e sua severidade depende da suscetibilidade das cultivares e das condições do ambiente do cultivo (Huelsman, 2004).

O patógeno *Botrytis cinerea* é um fungo necrotrófico que, se estabelece e multiplica inicialmente em tecidos mortos, colonizando posteriormente os tecidos vivos adjacentes (Jarvis, 1989). O fungo sobrevive como micélio e esclerócios em restos de culturas, principal fonte de inóculo primário. O fungo esporula abundantemente sobre os tecidos necrosados a temperaturas entre 15 e 20 °C e alta umidade relativa (>90%) e a liberação dos esporos ocorre nas horas mais quentes do dia, quando existem mudanças rápidas na umidade relativa, sendo eles posteriormente transportados pelas correntes de ar (Jarvis, 1989).

Uma vez que os conídios atingem a superfície da planta, aderem-se e germinam favorecidos por água livre, alta umidade relativa (>90%) e temperaturas amenas (20-25 °C) (Jarvis, 1989). Compostos gasosos também têm estimulado a germinação de esporos de *B. cinerea*. Assim, foi demonstrado que a produção de etileno estimulou a severidade do MC em estruturas florais e folhas de roseiras (*Rosa hybrida*), morangueiro (*Fragaria vesca* L.), tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill), pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.) (Elad & Volpin, 1988; McNicol et al., 1989).

O patógeno pode penetrar os tecidos através de ferimentos (Braun & Sutton, 1987) ou diretamente pela ação do apressório, mediada pela secreção de enzimas degradadoras da parede celular como as exo-endopoligalacturonase (Rha et al., 2006). A infecção é favorecida por

temperaturas de 15-25 °C. *Botrytis cinerea* pode produzir infecções quiescentes (latentes), quando as condições de ambiente ou estado fisiológico dos tecidos do hospedeiro são conducivas para a penetração, mas não para o crescimento ativo do patógeno (Jarvis, 1989). Estas infecções não têm sido evidenciadas em tecidos de fúcsia, mas constatadas em tecidos de diferentes espécies tais como folhas novas de morangueiro, onde *B. cinerea* permanece latente nas células da epiderme até as folhas senescerem (Braun & Sutton, 1987), na haste do tomateiro, onde *B. cinerea* pode permanecer quiescente até por 12 semanas (Jarvis, 1989), nos botões florais de roseiras, que sob condições de alta umidade relativa durante o armazenamento e transporte a 2-5 °C (Volpin & Elad, 1991), nas flores de roseiras durante a pós-colheita (Elad, 1988) e em estruturas florais e bagas de uva (*Vitis vinifera* L.) (Keller et al., 2003).

Uma vez transcorrido o período de latência o fungo coloniza o tecido da planta colonizando e macerando os tecidos, produzindo esporos e reiniciando um novo ciclo de infecção (Benito et al., 2000).

O manejo do MC integra praticas nas que se incluem a eliminação do tecido doente das plantas; alteração da temperatura e umidade relativa do ambiente; uso de fungicidas e de agentes de biocontrole (Elad, 1988; Jarvis, 1989; Elad et al., 1995; Hausbeck & Moorman, 1996; Sutton et al., 1997).

A aplicação dos fungicidas sintéticos tem sido a principal forma de combater a doença causada por *B. cinerea* (Wilson, 1997; Morandi, 2001). O uso inadequado dos fungicidas tem levado à seleção de estirpes resistentes, gerando a ineficiência do controle químico. Inicialmente, foi citado o surgimento de estirpes resistentes os benzimidazóis, como carbendazim, benomil e

tiabendazol, (Leroux et al., 1999) e a seguir as dicarboximidas, como iprodione, procimidone e vinclozolin (Latorre et al., 1994). Em cultivos protegidos de ornamentais, estirpes de *B. cinerea* resistentes aos dois grupos de fungicidas antes citados foram também constatadas (Ghini, 1996; LaMondia & Douglas, 1997; Yourman et al., 2001). A resistência de estirpes de *B. cinerea*, ao grupo anilinoimidazóis, foram encontradas nos vinhedos no Chile e em culturas protegidas de pepino, feijão, tomate, abóbora, berinjela e pimenta na Espanha (Latorre et al., 2002; Moyano et al., 2004). Também os inibidores da síntese de esterol (tebuconazol e fenethanil) têm selecionado estirpes de *B. cinerea* em locais onde foram mal utilizados ou subdosificados (Elad, 1992).

Outras desvantagens do uso de fungicidas para o controle do MC são os riscos à saúde dos trabalhadores advindo do uso inadequado dos fungicidas e, particularmente para os exportadores o aumento das restrições feitas a estes produtos nos países da Europa que vem limitando o uso de fungicidas na produção de flores e exigindo a comercialização destas culturas com mínimos níveis de agrotóxicos (Köhl et al., 1998). Essa situação gerou a necessidade de desenvolver métodos alternativos de controle, e o biocontrole é um deles (Michereff, 2004).

O controle biológico de um patógeno do filoplano é geralmente feito pela introdução e estabelecimento de antagonistas nas folhas. O antagonista aplicado, para ser bem sucedido, deve multiplicar-se e colonizar a superfície da planta (Bettiol, 1991). Leveduras e bactérias antagonistas aplicadas na superfície foliar têm sido relatadas por reduzir a infecção de *B. cinerea* (Elad et al., 1994; Zahavi et al., 2000; Helbig, 2001).

Aplicações foliares de *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp.,

Clonostachys rosea (Link: Fr.) Schroers, Samuels, Seifert & Gams e *Ulocladium atrum* Preuss têm sido efetivas na supressão da esporulação de *B. cinerea* em numerosos hospedeiros, tais como morangueiro (Sutton & Peng, 1993a; Valdebenito-Sanhueza et al., 1997), videira (Harman et al., 1996; Latorre et al., 1997), florestais (Grigoletti et al., 2004). Nas plantas ornamentais *C. rosea* suprimiu a esporulação de *B. cinerea* ciclâmen (*Cyclamen persicum* Mill.), begônia (*Begonia x hiemalis* Fotsch.), gerânio (*Pelargonium* L.), roseiras (Sutton et al., 1997; Köhl et al., 1998; Morandi et al., 2001).

Para se obter um efetivo controle de doenças da parte aérea pelos antagonistas, eles devem exercer competição com o patógeno pelo sitio de, infecção colonizando o filoplano antes da sua instalação, diminuir a esporulação e reduzir a formação de estruturas de sobrevivência (Fokkema, 1993). Contudo, no caso do controle do MC com *C. rosea* o antagonista causa inibição da infecção, colonização, esporulação e disseminação do patógeno. O antagonista é destacado pela sua eficiência no controle do MC competindo como patógeno na colonização de folhas jovens e tecidos senescentes de morangueiro, begônia, ciclâmen, gerânios. Tanto o antagonista como o patógeno colonizam e esporulam nas folhas mortas (Sutton et al., 1997).

Em consideração as restrições do controle químico, o controle biológico com *C. rosea* torna-se uma opção eficiente para o manejo de doenças de plantas causadas por *B. cinerea*.

2.4 O fungo *Clonostachys rosea*

Segundo a nova classificação polifásica dos seres vivos, baseada nas características fenotípicas e na análise da seqüência do RNA ribossomal, o

reino Fungi foi mudado para reino Mycota (da Luz, 2000). O reino Mycota é dividido nos filios: Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota. O fungo *C. rosea* (*Gliocladium roseum* Bainier), anamorfo de *Bionectria ochroleuca* Schwein. (*Nectria ochroleuca* (Schw.) Berk.), pertence ao filo Ascomycota, ordem Hypocreales (Rehner & Samuels, 1994; Rossman et al., 1999; Schroers et al., 1999; Rossman et al., 2001).

Os gêneros *Clonostachys* e *Gliocladium* foram descritos por Corda em 1839 e 1840, cada um com uma espécie, *C. araucaria* Corda e *G. penicillioides* Corda (Schroers et al., 1999). Previamente um fungo descrito com dois tipos de conidióforos, verticilados e penicilados tinha sido chamado *G. roseum*. Os conidióforos verticilados apresentam poucas fiáides divergentes e longas, com conídios aderidos por mucilagem em massas arredondadas. Posteriormente, os conidióforos penicilados com fiáides pequenas comprimidas e os conídios dispostos em forma de correntes são formados. A mesma espécie, com conidióforos dimórficos, é descrita como *Penicillium roseum* Link (1816), provavelmente o basônimo de *G. roseum* (Thom apud Schroers et al. 1999, p.366). Posteriormente é reconhecida como *C. araucaria* possivelmente a mesma espécie de *G. roseum*, mas não se reconhece como outro gênero (Thom apud Schroers et al. 1999, p.366). Posteriormente, *Clonostachys* é reconhecido como gênero e *C. araucaria* var. *confusa* é descrito como *G. roseum* de Bainier, possível sinonímia de *P. roseum* de Link (Pinketon apud Schroers et al. 1999, p.366). Poucos autores têm usado *C. araucaria*, mas *G. roseum* tem sido amplamente aceito (Schroers et al., 1999).

Estudos filogenéticos, baseados na análise de seqüência da região 5' da subunidade 28S do DNA ribossomal nuclear (rDNA), mostraram que

Gliocladium é um grupo polifilético dentro de Hypocreales. Na análise de parcimônia *bootstrap* se distinguem dois grupos monofiléticos com 93% *bootstrap*, onde *G. roseum*, junto com *Nectria* spp., formam um grupo separado de *G. penicillioides* e *Trichoderma virens* (= *G. virens*) (Rehner & Samuels, 1994). Também se diferenciam de outras espécies de *Gliocladium* pela forma assimétrica dos conídios, dispostos em correntes superpostas, e a formação de conidióforos verticilados e penicilados. Essas evidências moleculares e diferenças morfológicas conduzem à mudança da nomenclatura de *G. roseum* para *C. rosea* (Schroers et al., 1999).

Clonostachys rosea se caracteriza por apresentar colônias de aspecto granulado a felpudo, de cor branca, rosa ou salmão (Domsch et al., 1980). O fungo, em batata-dextrose-ágar (BDA), desenvolve micélio aéreo denso, com hifas de filamentos erguidos, o qual pode ser sem pigmento até cor branca, com massas de conídios brancas. Em ágar-milho-dextrose ou ágar-aveia, apresenta micélio com tonalidades amarelas ou laranjas com massas de conídios branca-amarelas à branca-alaranjada (Schroers et al., 1999).

Os conidióforos inicialmente são verticilados passando a penicilados. Os conídios verticilados predominam na parte jovem da colônia, cada um produzindo um conídio hialino. Os conidióforos secundários aparecem nas colônias a poucos dias de idade, podendo apresentar-se isolados ou agrupados, com dois a três verticilos e frequentemente ramificados (Schroers et al., 1999).

Os conídios são lisos, hialinos, levemente curvados, arredondados, hilum lateral, medem em média 5,8 x 2,7 μm , mas a forma e tamanho podem variar segundo o tipo do conidióforo. Os conídios dos conidióforos primários

apresentam-se pouco curvados e medem 8,1 x 3,1 μm , e os conídios dos secundários são menores com 5,2 x 2,7 μm (Schroers et al., 1999).

A forma teleomórfica raramente se apresenta em meio de cultura, tanto em isolados homotáticos ou heterotáticos. O fungo forma peritécios amarelos ou laranjas, de globosos a piriformes, dispostos isolados ou em densos grupos sobre o estroma, de 200-310 μm de diâmetro, de paredes lisas e finas, de 35-45 μm . As ascas são em forma de clava, de paredes lisas e finas medindo 50-68 x 5-9 μm . Os ascósporos são elipsoidais, hialinos, de paredes lisas a levemente equinuladas, medindo 10-12 x 3-4 μm (Domsch et al., 1980).

Os isolados de *C. rosea* apresentam variação no tipo de colônia e na proporção dos dois tipos de conidióforos (Domsch et al., 1980).

Diferentes técnicas moleculares têm sido empregadas na identificação de fungos antagonistas, auxiliando na caracterização de estirpes, em estudos de diversidade genética e no monitoramento de estirpes introduzidas no ambiente (Bulat et al., 1998; Lübeck et al., 1999; Bulat et al., 2000; Paavanen-Huhtala et al., 2000; Bieliková et al., 2002; Latha et al., 2002; Brandão et al., 2002; Dodd et al., 2004; Inglis et al., 2005). As técnicas DNA polimórfico amplificado arbitrariamente (*Random Amplified Polymorphic DNA - RAPD*) (Bieliková et al., 2002), reação em cadeia da polimerase com oligonucleotídeos universais (*Universally Primed Polymerase Chain Reaction - UP-PCR*) (Bulat et al., 1998; Bulat et al., 2000), PCR com marcadores específicos de uma região de seqüência característica (*Sequence-Characterized Amplification Region - SCAR*) (Bulat et al., 2000) têm sido empregadas na identificação de *C. rosea*.

A utilização de marcadores RAPD tem sido empregada na análise

de *G. virens*, *C. rosea* e *Gliocladium* sp. apresentando diferenças de cinco, dois e quatro padrões de bandas, respectivamente (Bieliková et al., 2002). A técnica PCR-RAPD, descrita em 1990 (Williams et al., 1990), uma modificação da PCR, utiliza oligonucleotídeos iniciadores com 6-12 bases e seqüência arbitrária, permitindo revelar o polimorfismo dentro de amostras de DNA desconhecidas, sem a necessidade de hibridização ou seqüenciamento do DNA. O produto da reação consiste em um número de fragmentos de DNA de diferentes comprimentos e seqüência de nucleotídeos e se visualiza diretamente em forma de uma banda no gel de eletroforese (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A UP-PCR tem sido usada em estudos de diversidade genética e identificação infra-específica (Bulat et al., 1998; Lübeck et al., 1999). Assim, o uso da técnica tem permitido caracterizar estirpes de *Trichoderma* spp. apresentando perfil de bandas heterogêneo, mas com algumas variações para três estirpes de *T. harzianum* com perfil idêntico. A análise de estirpes de *G. roseum* foram menos heterogêneas, indicando uma relativa homogeneidade no genoma da espécie (Bulat et al., 1998). A técnica UP-PCR é um método semelhante ao RAPD, o qual amplifica o DNA sem prévio conhecimento da seqüência do DNA, gerando perfis de bandas. A reação ocorre com alta temperatura de anelamento, resultando em um produto altamente reproduzível (Bulat et al., 1998; Bulat et al., 2000).

A SCAR-PCR usa marcadores que amplificam uma região de seqüência característica e permite a detecção de uma estirpe específica. O método tem sido aplicado na detecção de estirpes individuais de *C. rosea* a partir de solo inoculado, possibilitando o monitoramento de linhagem liberada

no solo (Bulat et al., 2000).

Adicionalmente, marcadores intron têm sido empregados em estudos do genoma. A maioria dos marcadores não codifica para genes funcionais e apresenta seqüência muito variável. As seqüências intron detectadas na região 3' do rDNA da subunidade do gene 18S, apresentaram polimorfismo nas formaes speciales de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. (Suga et al., 2000). A PCR com marcadores intron tem permitido identificar polimorfismos em estirpes comerciais de *Saccharomyces cerevisiae*, possibilitando a identificação e o monitoramento no processo de fermentação (De Barros et al., 1996).

Clonostachys rosea se caracteriza por ser habitante do solo em regiões tropicais, temperadas, com alta capacidade saprofítica e principalmente micoparasita de ascomicetos, hifomicetos (Domsch et al., 1980; Papavizas, 1985; Sutton et al., 1997; Schroers et al., 1999). O fungo coloniza diversos órgãos de plantas sem causar doença. Há relatos da colonização endofítica do fungo em raízes, hastes, sementes de soja (*Glycine max*, (L.) Merr. (Mueller & Sinclair, 1981), vasos do xilema de videira (Esseln & Weltzien, 1997), folhas de morangueiro (Sutton & Peng, 1993a; Valdebenito-Sanhueza et al., 1997), framboeseiro (*Rubus idaeus* L.), amoreira (*Rubus armeniacus* Focke) (Yu & Sutton, 1997; Zamboni-Pinotti et al., 2005), roseiras (Morandi et al., 2003) e hastes de tomateiro (Sutton et al., 2002).

O fungo se desenvolve entre 20-35 °C, com uma temperatura mínima de 4-8 °C e uma ótima de 25-28 °C. O pH ótimo é de 6,4-8,0, mas tolera uma variação de 3,2-10,5 (Domsch et al., 1980).

2.5 Doenças controladas por *Clonostachys rosea*

O fungo *C. rosea* tem sido relatado como antagonista eficaz de numerosos fungos (Barnett & Lilly, 1962; Domsch et al., 1980; Schroers et al., 1999) e como agente de biocontrole de doenças de plantas (Papavizas, 1985; Bettioli, 1991; Sutton & Peng, 1993a; Bettioli, 1996; Sutton et al., 1997).

Clonostachys rosea é um antagonista efetivo de patógenos de plantas em diversos ambientes. Assim, as aplicações no solo de *C. rosea* têm controlado a podridão da raiz do pepineiro causada por *Phomopsis sclerotioides* van Kesteren (Moody & Gindrat, 1977) e a viabilidade dos microesclerócios de *Verticillium dahliae* Kleb (Keinath et al., 1991).

Filtrados de cultura de *C. rosea* tem inibido a zoosporogênese de *Phytophthora megasperma* Drechs f.sp. *glycinea* TL Kuan & Erwin (Alheeti & Sinclair, 1984). Em cultura de repolho (*Brassica campestris* subsp. *pekinensis* (Lour) G. Olsson), duas aplicações de suspensão de esporos (10^8 .mL⁻¹) de *C. rosea* (isolado IK726) reduziram a incidência da podridão da folha e da cabeça causada por *Pythium tracheiphilum* Matta (Moller et al., 2003).

O fungo *C. rosea* tem sido aplicado em sementes para o controle de doenças da espermosfera, se multiplica no solo ou na rizosfera inibindo os patógenos por competição, micoparasitismo ou antibiose (Papavizas, 1985). O tratamento sementes de cenoura (*Daucus carota* L.) com a estirpe IK726 de *C. rosea* tem controlado o tombamento causado por *Alternaria dauci* (JG Kühn) JW Groves & Skolko e *A. radicina* Meier, Drechs., & ED Eddy com igual eficiência que o fungicida iprodione (Jensen et al., 2004). Inoculações de sementes de cevada (*Hordeum vulgare* L) com conídios de *C. rosea* controlaram 80% da doença causada por *Fusarium culmorum* (WG Sm.) Sacc.

(Jensen et al., 2000). Sementes de ervilha (*Pisum sativum* L.), mergulhadas em suspensão de esporos da estirpe ACM941 de *C. rosea* (10^7 conídios.mL⁻¹) apresentaram incremento *in vitro* na germinação (44%), na emergência de plântula (22%) e reduziram a severidade do complexo da podridão da raiz (76%) causado por *A. alternata* (Fr.:Fr.) Keissl., *Aphanomyces euteiches* Drechs., *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *pisi* (Linford) Snyder et Hansen., *F. solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *pisi* (FR Jones) WC Snyder & HN Hans., *Mycosphaerella pinodes* (Berk. & A. Bloxam) Vesterg., *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn (AG-4) e *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, resultados semelhantes aos obtidos como o fungicida thiram (Xue, 2003).

Clonostachys rosea tem sido eficiente no controle de doenças da área foliar. Assim em fumo (*Nicotiana tabacum* L.), plantas inoculadas na raiz com uma suspensão de conídios de *C. rosea* (10^6 .mL⁻¹), apresentaram menor severidade de oídio (*Erysiphe orontii* Cast.) quando comparadas com a testemunha ativando possivelmente mecanismos de resistência das plantas (Lahoz et al., 2004).

A aplicação de uma suspensão de esporos de cinco estirpes de *C. rosea* (5×10^5 .mL⁻¹) em cacauzeiros (*Theobroma cacao* L.), em condições comerciais, reduziu a incidência de podridão-de-monilofora (*Moniliophthora roreri* Cif & Par) em 24,9% comparada ao controle cultural (Krauss & Sobernais, 2001).

Aspersões foliares de suspensões de conídios de *C. rosea* (5×10^6 .mL⁻¹) e de clorotalonil reduziram igualmente a severidade da mancha foliar causada por *Botrytis squamosa* em cebola (*Allium cepa* L.). O antagonista reduziu em 50-58% a severidade da doença quando comparado à testemunha,

(James, 1996). Também, as aspersões de *C. rosea* têm inibido a esporulação de *B. aclada* Fresen (syn. *B. allii* Munn) em folhas necrosadas de cebola (Yohalem et al., 2004).

2.6 Controle do Mofo Cinzento com *Clonostachys rosea*

Clonostachys rosea tem sido relatado como efetivo para o controle do MC (Peng & Kevan, 1992; Zhang et al., 1996; Valdebenito-Sanhueza et al., 1997; Köhl et al., 1998; Yu & Sutton, 1999; Sutton et al., 2002; Morandi et al., 2003; Grigoletti et al., 2004; Li et al., 2004; Zamboni-Pinotti et al., 2005; Nobre et al., 2005).

Em experimentos de campo, *C. rosea*, *Trichoderma viride* Pers. ex Fries e *Penicillium* sp. reduziram a esporulação de *B. cinerea* em folhas de morangueiro com igual eficiência quanto aplicações de clorotalonil (Peng & Sutton, 1991). A utilização de três ou quatro aplicações por semana de suspensões (10^6 ou 10^7 .mL⁻¹) de conídios de *C. rosea* foram suficientes para reduzir a incidência de *B. cinerea* nas infrutescências de morangueiro (Sutton, 1994).

A aspersão de suspensão de conídios de *C. rosea* ou a disseminação de conídios do antagonista pela abelha (*Apis mellifera* L.) em flores de morangueiro reduziu a incidência de *B. cinerea* em pétalas, estames e infrutescências. As abelhas disseminaram eficientemente o inóculo de *C. rosea* nas flores e suprimiram o patógeno tanto nas flores quanto nos frutos (Peng & Kevan, 1992). O uso de abelhas como disseminador de conídios de *C. rosea* também foi eficiente na proteção de frutos de framboeseiro contra a podridão de MC (Sutton & Peng, 1993b).

Em hastes destacadas de tomateiro hidropônico, *C. rosea* inibiu *B. cinerea* tanto quanto o fungicida iprodione (Sutton et al., 2002) e em aplicações no ápice das plantas de alfafa (*Medicago sativa* L.), o fungo suprimiu a podridão de vagens e sementes causada por *B. cinerea*, incrementando a produção de sementes (Li et al., 2004).

O uso de *C. rosea* é citado no controle do MC em plantas ornamentais. Aplicações de conídios de *Ulocladium atrum* (10^6 .mL⁻¹) e *C. rosea* (10^7 .mL⁻¹), a cada duas ou três semanas, foram tão efetivas quanto as aplicações de fungicidas químicos no controle de MC em ciclâmen (Köhl et al., 1998).

Clonostachys rosea ou *U. atrum*, aplicado em roseiras em vaso, durante o estágio vegetativo, tem reduzido a incidência e inibido a esporulação de *B. cinerea* tanto quanto o fungicida iprodione (Yohalem, 2004).

No Brasil, desde 1995, vem-se trabalhando com *C. rosea* para o controle biológico do MC no morangueiro em casa de vegetação (Valdebenito-Sanhueza & Perazzolo, 1995). Suspensões de esporos de *C. rosea*, na concentração de 10^6 conídios.mL⁻¹, aplicadas semanalmente em morangueiros cultivados em casa de vegetação (Valdebenito-Sanhueza et al., 1997), e em folhas destacadas de morangueiros, framboeseiro e amoreira controlaram eficientemente o MC (Zamboni-Pinotti et al., 2005).

Isolados de *C. rosea*, provenientes de solos, folhas verdes ou mortas de diferentes espécies de plantas do Brasil, reduziram a esporulação de *B. cinerea* em folhas de roseira (81-97,4%), morangueiro (87,6-96,8%), eucaliptos (*Eucalyptus globulus* Labill.) (63,7-89,7%) e tomateiros (100%) (Nobre et al., 2005).

Os trabalhos precedentes evidenciam que *C. rosea* pode atuar no controle de MC por colonizar o substrato antes e mais eficientemente que o patógeno e reduzir significativamente a esporulação do mesmo.

2.7 Variáveis da efetividade de *Clonostachys rosea*

A interação entre *C. rosea* e *B. cinerea* é influenciada por diversos fatores do hospedeiro, do ambiente (umidade, temperatura, intensidade luminosa), concentração e tipo de inóculo, momento de aplicação entre outros (Sutton et al., 1997).

A eficácia de *C. rosea* depende do estado fenológico do tecido e da espécie hospedeira. Assim, *C. rosea* foi 30 a 70% menos eficaz em folhas senescentes do que nas pre-senescentes e nula nas folhas mortas do morangueiro, begônia e ciclâmen (Sutton et al., 1997). Adicionalmente, foi constatado que *C. rosea* germina, se estabelece endofiticamente e esporula em folhas e pétalas maduras, senescentes e mortas de roseiras. A germinação e esporulação do antagonista foi moderada em folhas e pétalas maduras e senescentes, e mais altas nos tecidos mortos (Morandi & Maffia, 2000).

Os fatores do ambiente, água livre, umidade relativa e temperatura afetaram a germinação, colonização e esporulação do antagonista e do patógeno, afetando a eficácia do controle do MC (Sutton et al., 1997).

As flutuações de água livre na superfície das folhas, com alternância de períodos úmidos e secos afetam a colonização e a eficácia de *C. rosea* contra *B. cinerea* (Köhl et al., 1998; Köhl et al., 1999). As hifas do fungo, especialmente o tubo germinativo, são sensíveis à falta de umidade (Köhl et al., 1995) e essa alternância afeta o crescimento de *C. rosea*, principalmente no

primeiros dias após aplicação (Köhl et al., 1995). Em *Picea mariana* (P. Mill.) e outros hospedeiros, é necessário um período de umidade após a aplicação para otimizar o crescimento do antagonista (Sutton et al., 1997).

A umidade relativa favorável ao crescimento de *C. rosea* encontra-se numa faixa estreita que se encontra entre 95 e 98% e este fator é decisivo no controle de *B. cinerea*. Assim em discos de folha de feijão a umidade relativa de 98% teve maior redução da esporulação do patógeno do que a 95%, e foi nula a 93% (Szandala & Backhouse, 2001).

A temperatura é outro parâmetro que afeta a atividade antagônica de *C. rosea* contra *B. cinerea*. Assim, *C. rosea* suprimiu a esporulação de *B. cinerea* à temperatura entre 20-30 °C em folhas de morangueiro, framboeseiro, ciclâmen, begônia e gerânio, porém a ação biocontroladora diminuiu nas temperaturas menores de 15 °C (Sutton et al., 1997). Contudo, alguns isolados desta espécie tem reduzido a esporulação de *B. cinerea* em folhas necróticas de morangueiro à temperaturas entre 10-25 °C (Sutton & Peng, 1993a).

A luz solar, particularmente a radiação UV pode afetar a sobrevivência de esporos de fungos antagonistas (de Melo, 1998). Por isto as aplicações de conídios de *C. rosea* devem ser realizadas ao fim da tarde nos cultivos de morangueiro, visando favorecer a instalação do antagonista. Nesta condição a incidência de luz UV é mínima e se assegura a disponibilidade de umidade para a germinação dos propágulos do fungo (Peng & Sutton, 1991).

A concentração de inóculo de *C. rosea* é fundamental para o estabelecimento apropriado nos tecidos de plantas. Essa varia com a espécie, idade, órgão da planta, concentração do patógeno e condições climáticas. O antagonista controlou o MC quando foi aplicado na mesma ou maior

concentração de *B. cinerea* em folhas e flores de ciclâmen e begônia (Sutton et al., 1997). As combinações de suspensões de conídios de *B. cinerea* (10^3 - 10^6 .mL⁻¹) e de *C. rosea* (10^4 - 10^8 .mL⁻¹) foram suficientes para obter 90 a 100% de controle do MC em folhas de framboeseiro. No estudo de suspensões com conídios de *C. rosea* (10^4 a 10^8 .mL⁻¹) e de *B. cinerea* (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 .mL⁻¹) a redução total da esporulação do patógeno nas folhas e mais do que 97% nas hastes do framboeseiro foi obtida quando o antagonista foi aplicado com 10^7 conídios.mL⁻¹ (Yu & Sutton, 1998).

Em cultivos desenvolvidos no campo e em casa vegetação, *C. rosea* (10^6 - 10^8 conídios.mL⁻¹) controlou o MC (Sutton et al., 1997) e a concentração de 10^6 conídios.mL⁻¹ foi eficaz para controle do MC em morangueiro, ciclâmen, begônia, tomateiro, roseira e *Picea mariana* (Sutton & Peng, 1993a; Zhang & Hopkin, 1994; Zhang & Hopkin, 1996; Valdebenito-Sanhueza et al., 1997; Köhl et al., 1998; Morandi et al., 2001; Sutton et al., 2002), e 10^7 conídios.mL⁻¹ em framboeseiro (Yu & Sutton, 1997; Yu & Sutton, 1998; Zamboni-Pinotti, 2005).

Propágulos de *C. rosea*, constituídos por conídios ou biomassa seca, podem ter eficiência variável na supressão de *B. cinerea* (Zamboni-Pinotti, 2005). A concentração de conídios (10^6 .mL⁻¹) e biomassa seca (160 mg.L⁻¹) da estirpe G2 de *C. rosea* reduziram a colonização e esporulação de *B. cinerea* em folhas de morangueiro (Dall'Onder, 1997). Trabalhos feitos com suspensões de conídios e micélio das estirpes GSAL e GFO4 mostraram que igual eficiência na supressão de *B. cinerea* em morangueiro. Entretanto, quando foram avaliadas em framboeseiro somente a suspensão de conídios de GSAL e GFO4 exerceram o maior controle do MC nas folhas de framboeseiro (Zamboni-Pinotti, 2005).

Clonostachys rosea pode atuar diretamente na redução da infecção do hospedeiro quando aplicado antes da infecção dos tecidos pelo patógeno e/ou na redução da colonização dos tecidos e da produção do inóculo quando estes são tratados após a infecção de *B. cinerea*. A diminuição da esporulação de *B. cinerea* tem sido observada quando folhas de morangueiro e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), folhas e estruturas florais de framboeseiro foram tratadas com *C. rosea* após a infecção por *B. cinerea* (Sutton & Peng, 1993a; Yu & Sutton, 1998; Szandala & Backhouse, 2001).

Aplicações de *C. rosea* 32 h antes ou ao mesmo tempo em que o patógeno reduziram drasticamente a esporulação de *B. cinerea* em discos de folhas, segmentos de hastes e estames de framboeseiro, mas suprimiu moderadamente quando foi aplicado 32 h depois do patógeno (Yu & Sutton, 1997). O tratamento preventivo com *C. rosea* em plântulas de coníferas reduziu a incidência de *B. cinerea* em aproximadamente 80% (Zhang et al., 1996).

Outro fator que afeta a eficiência de *C. rosea* no controle do MC é a sua sensibilidade a alguns fungicidas. Assim, os fungicidas vinclozolin e diclofuanid inibiram o crescimento micelial de *C. rosea*. Entretanto, mancozeb teve apenas pequeno efeito inibitório sobre o fungo, indicando a possibilidade de aplicações conjuntas do antagonista com este fungicida (Morandi, 2001). Aspersões alternadas de clorotalonil, propineb, diclofluanida, ziram, sais de cobre mais mancozeb, mancozeb, metiram ou azufre e *C. rosea* foram tão efetivas quanto às aplicações de *C. rosea* e ambas foram superiores aos fungicidas no controle do MC em morangueiro (Chaves & Wang, 2004). Assim, com a integração de agentes químicos e biológicos de controle, pode-se reduzir o uso de produtos químicos e reduzindo desenvolvimento de

populações do patógeno resistentes a fungicidas.

2.8 Mecanismos de ação de *Clonostachys rosea*

Os mecanismos envolvidos nas interações entre microrganismos têm sido classificados como micoparasitismo, competição por substrato e nutrientes, lise enzimática e antibiose, podendo acontecer simultaneamente (Papavizas, 1985; Sutton et al., 1997; Hjeljord & Tronsmo, 1998; Vero & Mondino, 2002).

Clonostachys rosea é conhecido como um micoparasita de hifas, esporos, esclerócios e corpos frutíferos de diversos fungos, entre eles *Botrytis cinerea* (Barnett & Lilly, 1962; Domsch et al., 1980; Lim & Chan, 1986; Yu & Sutton, 1997; Sutton et al., 1997; Li et al., 2002). Em um estudo sobre estruturas de micoparasitismo sobre grãos de pólen de alfafa, observaram-se hifas de *C. rosea* iniciando o processo de infecção em conídios e tubos germinativos de *B. cinerea* por meio do contacto direto da ponta da hifa sem a formação de apressório e com posterior colapso citoplasmático (Li et al., 2002). Existem diferenças entre os graus de micoparasitismo de *B. cinerea* por *C. rosea*, dependendo da parte da planta onde se estabelecem. Assim, *C. rosea* suprimiu a germinação e crescimento do tubo germinativo de *B. cinerea* com pouca interação parasítica, sobre as folhas de frambeoseiro. Na haste, *C. rosea* apresentou moderada supressão do crescimento do tubo germinativo e intenso parasitismo de *B. cinerea*. A hifa de *C. rosea* se ramifica rapidamente (32-72 h) e cresce envolvendo conídios e hifas de *B. cinerea* em presença de alta umidade. As células do conídio e o tubo germinativo de *B. cinerea* colapsam e perdem o conteúdo citoplasmático. Na superfície dos estames, o

antagonista reduziu a colonização de *B. cinerea*, mas não suprimiu a germinação, o crescimento do tubo germinativo, a formação do apressório, e o grampo de infecção de *B. cinerea* (Yu & Sutton, 1997).

Clonostachys rosea tem a capacidade de crescer endofiticamente em tecidos imaturos permitindo competir com o patógeno na colonização dos tecidos senescentes de morangueiro, begônia, ciclâmen, gerânios, tomateiro, pimentão, pepineiro, framboeseiro, mudas de coníferas, e esporular em folhas mortas, tal como *B. cinerea* (Sutton & Peng, 1993a; Yu & Sutton, 1997; Sutton et al., 1997; Morandi et al., 2001; Sutton et al., 2002; Zamboni-Pinotti et al., 2005; Nobre et al., 2005). O antagonista tem habilidade de colonizar mais rapidamente os tecidos senescentes que o patógeno, ocupando o mesmo nicho, mas não o suplanta em tecido já colonizado (Sutton et al., 1997). *Clonostachys rosea* estabeleceu-se em folhas verdes, senescentes ou mortas de roseira e suprimiu a esporulação do patógeno em mais de 96% (Morandi et al., 2001).

A produção de enzimas extracelulares que degradam a parede celular dos patógenos é outra forma de interação entre os microrganismos (Harman & Kubicek, 1998). Em um estudo sobre métodos de detecção de enzimas extracelulares, duas estirpes de *C. rosea* e três de *G. virens* demonstraram um amplo espectro desta atividade enzimática (McAfee et al., 2001).

Recentes estudos mostram a capacidade de estirpes de *C. rosea* em produzir enzimas extracelulares que degradam a parede celular, incluindo as enzimas que degradam quitina, glucano e celulose (Mamarabadi et al., 2004). Estirpes de *C. rosea* tem produzido enzimas extracelulares (quitina 1,4- β -

quitinobiosidase e glucano 1,3- β -glucosidase) que degradaram a parede celular de *Rhizoctonia cerealis* (Innocenti et al., 2003). Uma enzima extracelular da família da serina protease tem sido isolada de *C. rosea*; a enzima purificada tem degradado caseína, gelatina e cutícula de nematóides (Li et al., 2005).

A antibiose tem sido amplamente estudada mostrando ser importante em alguns sistemas e menos em outros. A antibiose refere-se à produção de substâncias tóxicas, por parte de um microrganismo, que atuam em baixas concentrações e tem seu efeito a curta distância em outros microrganismos. A antibiose é importante quando se dá em conjunto com outros mecanismos como competição e micoparasitismo, e atua sinergicamente com enzimas que degradam a parede celular (Howell, 1998; Vero & Mondino, 2002). Metabólitos com atividade antibiótica, derivados de poliquetídeos, têm sido isolados de *C. rosea*: três benzoquinonas (2,3-dihidroxi-5,6-dimetil benzoquinona, 2,3-dimetoxi-5,6-dimetil benzoquinona, 2-metoxi-3-hidroxi-5,6-dimetil benzoquinona) e uma quinidrona (2,3-dimetoxi-5,6-dimetil quinidrona) (Sivasithamparam & Ghisalberti, 1998).

Um outro modo de ação é a indução de resistência, na qual ocorrem numerosas mudanças bioquímicas nas plantas pela ação de agentes bióticos ou abióticos (Sutton et al., 1997; Vero & Mondino, 2002). A indução de resistência tem sido sugerida como mecanismo de ação de *C. rosea* para o controle de doenças (Sutton et al., 1997). A inoculação de raízes de fumo com suspensão de conídios de *C. rosea*, incrementou a atividade de 1,3- β -glucanase, 1,4- β -glicosidase, quitinase e isoenzima peroxidase, substâncias características da indução da resistência, e as folhas apresentaram menor severidade de oídio (*Erysiphe orontii*) comparadas com as tratadas com água

(Lahoz et al., 2004).

Recentes estudos têm constatado a promoção de crescimento de plantas pela incorporação de *C. rosea* ao solo. A promoção de crescimento pode ser induzida por fungos e bactérias através da produção de hormônios vegetais e vitaminas, solubilização de nutrientes e pelo controle do patógeno (de Melo, 1996). O antagonista tem estimulado o crescimento em plantas de aveia (*Avena sativa* L.), beterraba-açucareira (*Beta vulgaris* L) cultivadas em solo com *C. rosea* (Johansen, 2006). O inóculo de *C. rosea* no substrato hidropônico diminuiu a incidência da podridão das raízes, promovendo o crescimento e o vigor de plantas de pepino inoculadas com *Pythium* spp. (Liu & Sutton, 2002).

Os mecanismos de ação de *C. rosea* sobre *B. cinerea* observados nas diferentes espécies de plantas não têm sido evidenciados nos tecidos de fúcsia.

2.9 Método de avaliação do parasitismo por *Clonostachys rosea*

A utilização de discos ou segmentos de folhas de morangueiro, cebola, tomateiro, framboeseiro, amoreira, roseira, ciclâmen, pecíolos, flores, tem sido empregado como método de avaliação do controle biológico e seleção de antagonista a *B. cinerea* (Peng & Sutton, 1991; Peng & Kevan, 1992; Sutton & Peng, 1993a; Sutton, 1994; Köhl et al., 1995; James, 1996; Yu & Sutton, 1997; Sutton et al., 1997; Valdebenito-Sanhueza et al., 1997; Yu & Sutton, 1998; Morandi & Maffia, 2000; Morandi et al., 2001; Sutton et al., 2002; Morandi et al., 2003; Yohalem et al., 2004; Zamboni-Pinotti et al., 2005; Nobre et al., 2005).

Botrytis cinerea caracteriza-se por colonizar os tecidos das plantas

matando os tecidos para obtenção de nutrientes e por produzir infecções quiescentes quando condições ambientais e do tecido do hospedeiro não são condutivas para o desenvolvimento da doença. *Clonostachys rosea* e *B. cinerea* colonizam os tecidos senescentes e para serem detectados nos tecidos verdes os mesmos devem ser necrosados. Vários trabalhos empregam o substrato composto por paraquat, cloranfenicol e ágar (PCA) para incubar os tecidos com a finalidade de causar a morte dos tecidos, com isso, estimular o crescimento do patógeno e antagonista que colonizam os tecidos endofiticamente, permitindo sua detecção (Sutton & Peng, 1993a; Sutton, 1994; Köhl et al., 1995; James, 1996; Dall'Onder, 1997; Yu & Sutton, 1997; Sutton et al., 1997; Valdebenito-Sanhueza et al., 1997; Sutton et al., 2002; Morandi et al., 2003; Yohalem et al., 2004; Nobre et al., 2005). Contudo, o uso de paraquat tem limitações por ser altamente tóxico, portanto, de alto risco à saúde das pessoas (Extension Toxicology Network, 1996).

Outro método de indução a morte do tecido para a detecção da colonização interna por microrganismos, é o congelamento. O tratamento de pecíolos de morangueiro com temperaturas de -15 e -20 °C permitiu a detecção da infecção latente de *Colletotrichum* spp. tanto quanto com o paraquat (Mertely & Legard, 2004). Nos discos de folhas de amoreira, framboeseiro e morangueiro inoculadas com *B. cinerea* e *C. rosea*, posteriormente, submetidos a -15 °C por 30 min, foi favorecida a detecção do patógeno e do antagonista (Zamboni-Pinotti, 2005). Esse método de congelamento de tecidos surge como uma alternativa ao uso do paraquat.

CAPÍTULO II

3. CONGELAMENTO DE BROTOS E FOLHAS DE FÚCSIA COMO ALTERNATIVA AO USO DE PARAQUAT NA DETECÇÃO DE INFECÇÃO LATENTE DE *Botrytis cinerea*

3.1 INTRODUÇÃO

Fúcsia (*Fuchsia speciosa* Hort.) é propagada por estacas constituídas por 2 a 3 cm de haste, retiradas de plantas matrizes e colocadas em substrato para enraizar em casa de vegetação. A produção de mudas de fúcsia requer 10 h de luz e 14 h de escuro, proporcionado pela cobertura das plantas com lona preta, gerando assim condições de alta umidade, e de temperaturas entre 20-25 °C (Huelsman, 2004). Esse manejo favorece o vigor, a presença de água livre na superfície das plantas e na presença de ferimentos, o Mofo Cinzento (MC), causado por *Botrytis cinerea* (Pers. ex Fr.) é responsável por grandes perdas no cultivo. Esse patógeno infecta diversas culturas incluindo frutíferas, hortaliças e ornamentais, onde é citada a fúcsia (Jarvis, 1989).

A infecção das plantas por *B. cinerea* tem uma fase quiescente (latente) por dias ou semanas dependendo do hospedeiro e dos tecidos

infectados antes de induzir sintomas (Jarvis, 1989). Nessa fase *B. cinerea* após penetração as hifas podem permanecer inativas até as condições de ambiente ou estado fisiológico dos tecidos do hospedeiro tornam-se condutivas ao desenvolvimento do patógeno nos tecidos (Prusky, 1996). Isso ocorre, por exemplo, nas folhas do morangueiro, nas quais *B. cinerea* permanece nas células epidérmicas até as folhas tornarem-se senescentes (Braun & Sutton, 1987).

Entre os métodos para a detecção de infecções latentes, o uso do herbicida paraquat tem sido amplamente empregado. O paraquat (dicloreto de 1,1'- dimetil – 4,4'- bipyridínio, nome comercial Gramoxone) tem sido usado na detecção de infecções latentes de *Alternaria* spp., *Botrytis* spp., *Cercospora* spp., *Phomopsis* spp., *Monilinia fruticola* (Wint) Honey, e outros fungos com fase endofítica (Sinclair, 1991; Sutton & Peng, 1993a; Gindrat & Pezet, 1994; Biggs, 1995; Wittig et al., 1997; Valdebenito-Sanhueza et al., 1997; Adaskaveg et al., 2000; Morandi et al., 2003). O uso do meio paraquat (20 ppm, Gramoxone 200), junto com cloranfenicol (100 ppm) (Quemicetina 500) e ágar (10 g.L⁻¹) (PCA), também tem sido usado para avaliar a eficácia de *Clonostachys rosea* no controle do MC em folhas de diferentes espécies de plantas (Peng & Sutton, 1991; Sutton & Peng, 1993a; Zhang & Hopkin, 1994; Sutton et al., 1997; Valdebenito-Sanhueza et al., 1997; Morandi et al., 2001; Sutton et al., 2002; Morandi et al., 2003; Zamboni-Pinotti, 2005). Os tecidos, em contato com paraquat, morrem rapidamente, favorecendo o desenvolvimento e esporulação dos fungos. No entanto, o paraquat é um herbicida de contacto, altamente tóxico, segundo a classificação toxicológica da Environmental protection agency (EPA), pertence à categoria I, com risco de ser inalado e

absorvido através da pele e os olhos (Extension Toxicology Network, 1996). Portanto, substituir o uso desse herbicida no laboratório para a detecção de infecção latente de *B. cinerea* torna-se desejável. O método de congelamento dos tecidos de plantas tem sido efetivo na indução da esporulação de infecções latentes de *Colletotrichum* spp. em pecíolos de morangueiros e de *B. cinerea* em folhas de morangueiro, framboeseiro e amoreira (Mertely & Legard, 2004; Zamboni-Pinotti et al., 2005), não existendo referências em tecidos de fúcsia. Assim sendo, o objetivo desta pesquisa foi comparar o tratamento dos tecidos de folhas e brotos de fúcsia com paraquat e com congelamento na indução da morte dos tecidos, visando estimular o desenvolvimento de *B. cinerea*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Folhas de fúcsia completamente expandidas, colhidas de plantas da cv. 022, foram submetidas à -20 °C por 15 e 20 min e brotos por 60, 90 e 120 min, desinfestados com álcool 96 % por 1 min, seguido de hipoclorito de sódio 2% por 2 min, água esterilizada (AE) e secados com papel toalha. Discos destas folhas, com diâmetro de 1,7 cm, obtidos com um furador, foram incubados na superfície de meio Ágar-Água (AA) em placas de Petri por 10 dias a 24 °C e 12 h de luz. Um outro grupo de discos de folhas e brotos foi incubado igualmente na superfície de meio AA-paraquat (0,1 mL.L⁻¹) e em AA. A incidência do MC foi avaliada após 10 dias. O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo a parcela experimental constituída de quatro discos de folha ou brotos. As análises estatísticas foram realizadas pelo Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores (SANEST). Os dados foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste Duncan (5 %).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos trabalhos preliminares, a avaliação visual dos tecidos mostrou que o congelamento por menos do que 15 min e por menos do que 60 min de folhas e brotos, respectivamente, produziam ilhas de tecido não afetado. Assim, avaliou-se a manutenção à -20 °C por períodos maiores.

Não houve desenvolvimento de *Botrytis cinerea* nos discos de folhas sem tratamento (testemunha). Isto somente aconteceu quando os tecidos foram tratados com paraquat ou nos dois períodos de congelamento e mostraram efeito semelhante na detecção do patógeno (Figura 2). A importância do tratamento para detecção de infecção latente é evidenciada pela ausência de detecção no período de 10 dias nos discos de folhas não-tratadas (testemunha).

Na comparação dos tratamentos feitos nos brotos, observou-se que os submetidos a -20 °C/60 min e o paraquat se constatou maior de número de brotos com detecção do patógeno do que na testemunha. Os períodos maiores de congelamento (90 e 120 min) exerceram um efeito intermediário entre a detecção de *B. cinerea* na testemunha e a dos tratamentos paraquat e o congelamento por 60 min ($F=0,12$) (Figura 3).

De acordo com os resultados obtidos (Figuras 2 e 3), os métodos de congelamento (-20 °C) e paraquat favoreceram igualmente a expressão da colonização das folhas e brotos de fúcsia por *B. cinerea*. O tempo mínimo de

manutenção dos discos de folhas à -20 °C foi de 15 min, contudo quando preparadas as placas com discos de folhas, as amostras submetidas por 20 min foram as que apresentaram maior facilidade de manipulação. Esses resultados são semelhantes aos obtidos com morangueiro, no qual o congelamento de pecíolos a -15 °C (60 a 120 min), para detecção de *Colletotrichum* spp., não deferiu significativamente do tratamento com o herbicida (Mertely & Legard, 2004). O tratamento com congelamento (-15 °C/30 min) de discos de folhas de amoreira, framboeseira e morangueiro foi empregado nas avaliações para detecção de *B. cinerea* em plantas tratadas com *C. rosea* para o controle do MC (Zamboni-Pinotti, 2005). Portanto os resultados apresentados confirmam a eficácia do congelamento como método de detecção de infecções latentes de *B. cinerea* nos tecidos de plantas e, particularmente em fúcsia. O método tem potencial para ser utilizado na avaliação de tecidos de tratados com fungicidas e antagonistas, visando o controle do MC.

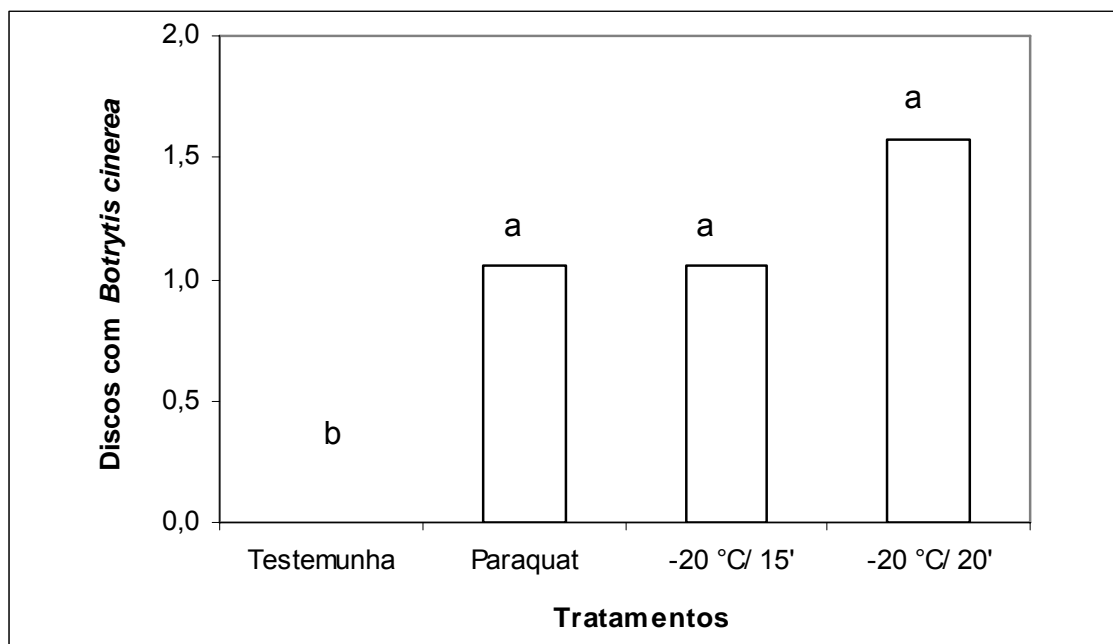


FIGURA 2 - Incidência de *Botrytis cinerea* em discos de folhas de fúcsia. Média de cinco repetições com quatro discos. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan (5%). CV 26,5%. Porto Alegre, 2004.

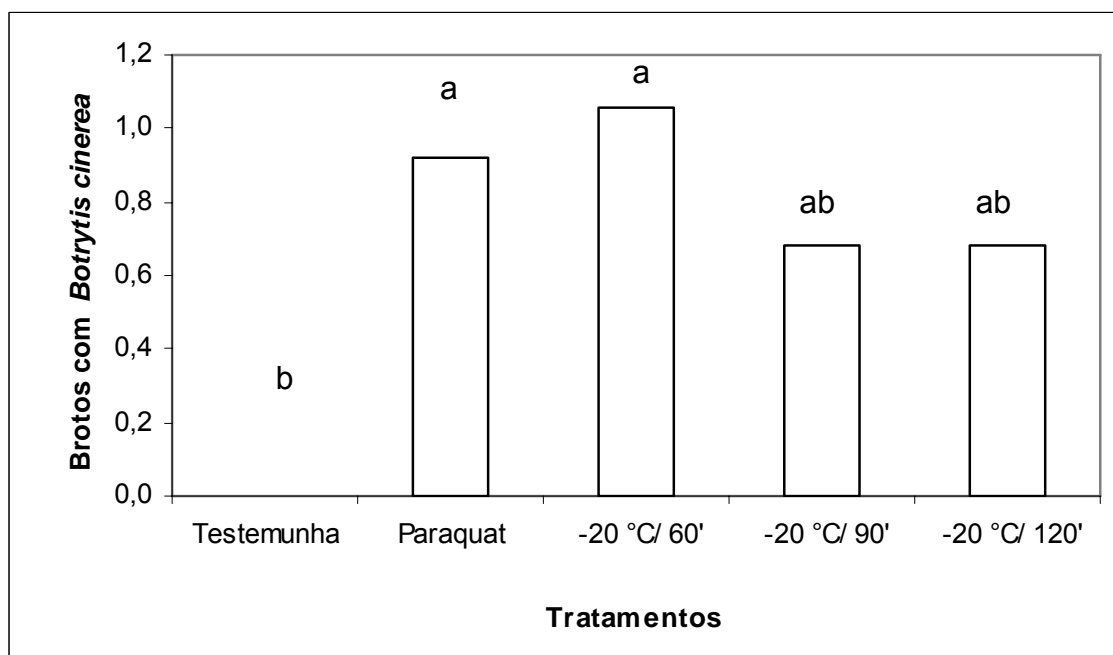


FIGURA 3 - Incidência de *Botrytis cinerea* em brotos de fúcsia. Média de cinco repetições com quatro brotos. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan (5%). CV 31,22%. Porto Alegre, 2004.

CAPITULO III

4. APLICAÇÃO PREVENTIVA E CURATIVA DE *Clonostachys rosea* EM FOLHAS DESTACADAS DE FÚCSIA PARA O CONTROLE DO MOFO CINZENTO

4.1 INTRODUÇÃO

O Mofo Cinzento (MC) é a principal doença das culturas ornamentais em ambientes protegidos, afetando todos os estádios de desenvolvimento das plantas. A alta umidade relativa, a falta de circulação do ar, a presença de água livre na superfície das plantas, junto à presença contínua de tecidos susceptíveis e senescentes, favorecem a infecção e esporulação de *Botrytis cinerea* (Pers. ex Fr.) (Jarvis, 1989; Hausbeck & Moorman, 1996) no sistema de produção de mudas de fúcsia (*Fuchsia speciosa* Hort.). Os sintomas do MC em fúcsia incluem decoloração, amarelecimento, encharcamento, murcha e necrose de folhas e ramos (Time Warner Cable, 2003; Huelsman, 2004).

O manejo da doença é feito, fundamentalmente, com aplicações de fungicidas e práticas culturais visando a redução da infecção e da esporulação do patógeno (Jarvis, 1989; Hausbeck & Moorman, 1996; University Illinois, 1997). Os fungicidas utilizados pertencem aos grupos dos benzimidazóis,

dicarboximidas, anilinoimidazóis e inibidores da síntese do ergosterol (Time Warner Cable, 2003). O uso freqüente e inadequado desses produtos acarreta riscos à saúde humana (Vero & Mondino, 2002) e tem favorecido o surgimento de estirpes de *B. cinerea* resistentes aos fungicidas, causando a perda de eficácia do controle químico (Latorre et al., 1994; Ghini, 1996; Leroux et al., 1999; Latorre et al., 2002). No presente, o mercado consumidor de produtos agropecuários exige ausência ou o uso mínimo de resíduos de agrotóxicos, o que tem estimulado o uso de agentes de biocontrole para o manejo do MC.

O antagonista *Clonostachys rosea* (Link: Fr.) Schroers, Samuels, Seifert & Gams pode ser usado no controle biológico de MC. Duas estratégias podem ser empregadas, preventiva da infecção ou supressiva da esporulação do patógeno nos tecidos necróticos (Szandala & Backhouse, 2001). *C. rosea* pode atuar na redução da infecção do hospedeiro quando coloniza os tecidos antes do patógeno e/ou na redução da colonização dos tecidos e da produção do inóculo, quando estes são tratados após a infecção e colonização de *B. cinerea*. A diminuição da esporulação de *B. cinerea* foi observada quando folhas de morangueiro (*Fragaria vesca* L.) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e folhas e estruturas florais de framboeseiro (*Rubus idaeus* L.) foram tratadas com *C. rosea* após a infecção por *B. cinerea* (Sutton & Peng, 1993a; Yu & Sutton, 1998; Szandala & Backhouse, 2001).

O intervalo entre a aplicação do antagonista e a infecção do patógeno é variável, dependendo da susceptibilidade dos tecidos do hospedeiro. Aplicações de *C. rosea*, 32 h antes ou ao mesmo tempo que o patógeno, reduziram drasticamente a esporulação de *B. cinerea* em discos de folhas, segmentos de hastes e estames de framboeseiro, mas suprimiu

moderadamente quando foi aplicado 32 h depois do patógeno (Yu & Sutton, 1997). O tratamento preventivo com *C. rosea* em plântulas de coníferas reduziu a incidência de *B. cinerea* em aproximadamente 80% (Zhang et al., 1996).

Estirpes de *C. rosea*, aplicadas antes da inoculação do patógeno, em folhas destacadas de morangueiro e framboeseiro, foram mais eficazes na redução da incidência do MC do que quando utilizadas após a infecção (Zamboni-Pinotti et al., 2004).

O período necessário para a germinação dos conídios de *C. rosea* varia com os tecidos do hospedeiro. Assim, conídios de *C. rosea* não germinaram após 4 h da inoculação, mas após 8, 12, 16 e 24 h germinaram, respectivamente 19, 67, 74 e 85%, sobre os discos de folhas de framboeseiro e 23, 80, 93 e 98% sobre os caules (Yu & Sutton, 1997).

O micélio de *C. rosea* tem sido observado no interior de tecidos de framboeseiro 24 a 32 h pós-inoculação (Yu & Sutton, 1997). O tipo de conidióforos do antagonista também varia com o período de incubação. Assim, os conidióforos verticilados foram abundantes 32 h após a inoculação e os penicilados apareceram a partir das 72 h nos tecidos de framboeseiro (Yu & Sutton, 1997).

Considerando que não existem informações sobre o impacto do biocontrole do MC em cultivo de fúcsia, o objetivo desta pesquisa foi determinar a eficácia do momento da aplicação de estirpes de *C. rosea* em diferentes intervalos no controle da doença.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Folhas completamente expandidas foram obtidas de plantas de fúcsia cv. 022, cultivadas em solo, desinfestadas com hipoclorito de sódio 0,5% por 2 min e lavadas duas vezes por água esterilizada por 1 min (AE) e inoculadas com as estirpes GSAL, G8 e GFO4 de *Clonostachys rosea* (10^6 conídios.mL⁻¹), 24 h antes (preventiva) e após (curativa) a inoculação com *Botrytis cinerea* (10^5 conídios.mL⁻¹). A testemunha foi inoculada apenas com o patógeno.

As estirpes de *C. rosea*, provenientes de folhas de morangueiro, foram obtidas da coleção da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho (EMBRAPA-CNPUV) de Bento Gonçalves, RS. O isolado de *B. cinerea* (Pers. ex Fr.) foi obtido de plantas de fúcsia cv. 022 de cultivo comercial. As estirpes do antagonista e o patógeno foram sempre mantidas em meio BDA à 24 °C e 12 h de luz.

As suspensões de conídios foram preparadas a partir de colônias com 10 dias de idade. Os conídios foram colhidos utilizando água destilada esterilizada (ADE) com Tween 20 a 0,01%, ajustando a concentração utilizando uma câmara de Neubauer.

As folhas foram incubadas em câmara úmida por três dias a 24 °C e 12 h de luz. Após, as folhas foram submetidas a -20 °C por 20 min e desinfestadas com álcool 96% por 1 min; hipoclorito de sódio 2 % por 2 min;

lavadas duas vezes em AE por 1 min e secas com papel toalha. Um disco de cada folha, com diâmetro de 1,7 cm, foi retirado com um furador e transferido para a superfície de meio de cultura Ágar-Água (AA) em placas de Petri, incubados por 10 dias a 24 °C e de 12 h de luz. O número de discos de folhas com sintomas e sinais de *B. cinerea* e sinais de *C. rosea* nas placas foi registrado.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 10 repetições, sendo cada uma constituída por quatro discos de tecido foliar. As análises estatísticas foram realizadas pelo Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores (SANEST). O número de discos com *B. cinerea* e *C. rosea* foi transformado por raiz quadrada ($x + 0,5$), submetido à análise de variância e as médias foram comparadas por teste Duncan (5%). As médias dos discos colonizados por *C. rosea* e por *B. cinerea* foram submetidas à análise de correlação linear.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As folhas de fúcsia inoculadas apenas com *Botrytis cinerea* apresentaram maior incidência de MC do que as tratadas com as três estirpes de *Clonostachys rosea* antes ou após a inoculação com o patógeno (Figura 4). A colonização dos tecidos internos das folhas de *C. rosea* apresentou 83% de correlação negativamente com a incidência de *B. cinerea*. Esse resultado confirma que, em fúcsia, o efeito inibitório de *C. rosea* sobre *B. cinerea* ocorre de igual forma que em outros hospedeiros, tanto em pré ou pós infecção de *B. cinerea*, competindo com o patógeno pelo sítio de infecção (Yu & Sutton, 1997; Zamboni-Pinotti, 2005).

A incidência de *B. cinerea* variou com o momento de aspersão dos conídios das estirpes de *C. rosea*, sendo menor nas folhas aspergidas antes da inoculação do patógeno. Não foi possível detectar diferença estatística entre as médias das três estirpes, embora GFO4 e G8, numericamente, proporcionaram 100% de controle e GSAL 94,5% (Figura 4). Essa tendência dos tratamentos se manteve quando as folhas foram tratadas com as estirpes de *C. rosea* após a aspersão dos conídios do patógeno. Os resultados apresentados são semelhantes aos observados nas folhas de framboeseiro quando tratadas com *C. rosea*, 32 h antes e ao mesmo tempo da inoculação do patógeno; onde a esporulação de *B. cinerea* atingiu 5 e 10%, respectivamente, enquanto nas

tratadas 32 h após a inoculação, atingiu 30% e na testemunha mais de 90% (Yu & Sutton, 1997). O antagonista usado preventivamente tem reduzido a esporulação de *B. cinerea* em folhas de morangueiro e plântulas de coníferas (Zhang et al., 1996; Yu & Sutton, 1997; Zamboni-Pinotti et al., 2005).

A aplicação de *C. rosea* antes do patógeno é mais efetiva que a aplicação posterior, provavelmente porque o antagonista coloniza rapidamente os tecidos do hospedeiro e exerce competição pelo substrato, no filoplano e nos tecidos internos, impedindo o estabelecimento de *B. cinerea* (Sutton & Peng, 1993a; Sutton, 1994; Yu & Sutton, 1997). A necessidade de proteger as plantas preventivamente para assegurar o sucesso do biocontrole é relacionada a maior velocidade de germinação que o patógeno pode ter quando comparado ao antagonista (Yu & Sutton, 1997). Estas informações ainda não foram geradas em fúcsia.

Contudo, algumas estirpes de *C. rosea* podem ser efetivas também quando utilizadas após a inoculação com o patógeno (Sutton & Peng, 1993a; Szandala & Backhouse, 2001; Zamboni-Pinotti et al., 2004). O tratamento de folhas de amoreira, framboeseiro e morangueiro com suspensão de conídios das estirpes GSAL e GFO4, antes ou após o patógeno, resultou em igual controle do MC (Zamboni-Pinotti, 2005).

As estirpes GFO4 e G8 de *C. rosea*, aplicadas de forma preventiva, colonizaram maior número de discos de folhas de fúcsia do que a estirpe GSAL (87, 85, 52%, respectivamente), mas esta diferença não afetou a eficácia do controle. Porém, nas aplicações curativas, as estirpes não apresentaram diferenças significativas (Figura 5). Na testemunha não foi constatada a presença de *C. rosea*. Essa colonização diferencial das estirpes nos discos de

folhas também tem sido constatada em outras espécies de plantas. Em folhas de framboeseiro, GFO4 colonizou maior número de discos do que G8 e GSAL (30, 20 e 18%, respectivamente). Contudo, as estirpes não se diferenciaram em amoreira e morangueiro (Zamboni-Pinotti, 2005).

A eficácia das estirpes de *C. rosea* no controle do MC depende do estabelecimento nas folhas. Estirpes de *C. rosea* variaram na porcentagem de colonização da superfície de discos de folhas de roseira, morangueiro, eucalipto e tomateiro, tratados preventivamente. Treze estirpes de *C. rosea* suprimiram a esporulação do patógeno em 100%, 81,0-97,4%, 87,6-96,8%, 63,7-89,7% dos discos de folhas de tomateiro, roseira, morangueiro, eucalipto, respectivamente (Nobre et al., 2005). As variações na capacidade de colonização entre as estirpes de *C. rosea* nos diferentes hospedeiros, talvez estejam associadas às características da planta, à sucessão microbiana na superfície das folhas e às mudanças morfológicas e fisiológicas no desenvolvimento foliar (Nobre et al., 2005).

As concentrações de conídios das estirpes do antagonista e do patógeno usadas no experimento foram citadas em trabalhos de controle biológico do MC por *C. rosea* em várias espécies de plantas (Sutton & Peng, 1993a; Sutton et al., 1997; Valdebenito-Sanhueza et al., 1997; Szandala & Backhouse, 2001; Nobre et al., 2005; Zamboni-Pinotti, 2005).

Os resultados obtidos sugerem que a aplicação de *C. rosea* na dose de 10^6 conídios.mL⁻¹ para o controle do MC em fúcsia deve ser feita preventivamente.

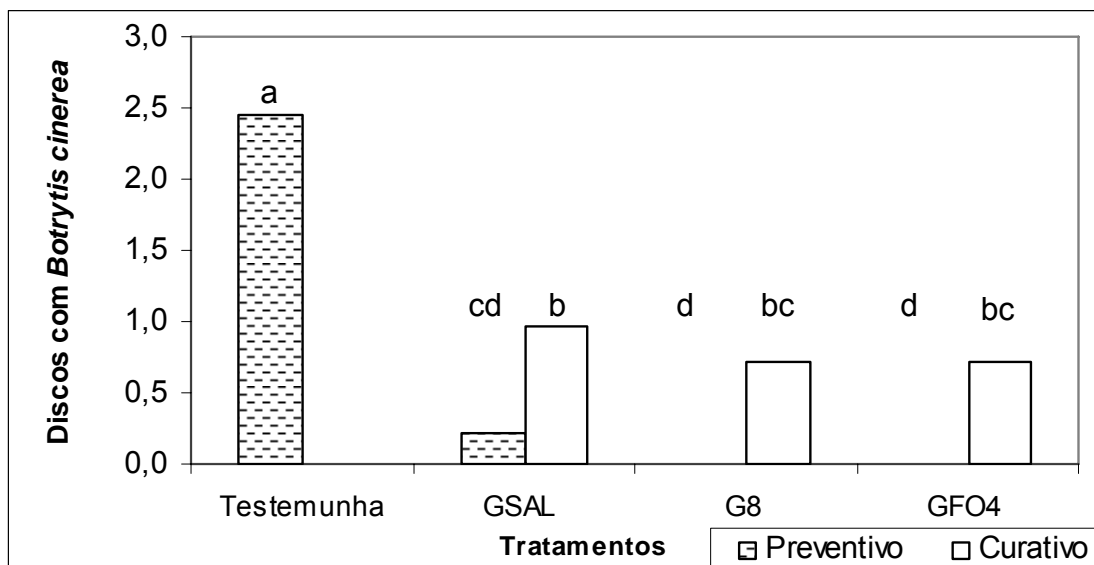


FIGURA 4. - Incidência de *Botrytis cinerea* em discos de folhas de fúcsia. Tratamentos: Testemunha - *B. cinerea*; estirpes de *Clonostachys rosea* - GSAL, G8 e GFO4 - aplicadas antes (preventivo) ou depois (curativo) da inoculação com o patógeno. Média de 10 repetições com quatro discos. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan (5%). CV 29,36%. Porto Alegre, 2005.

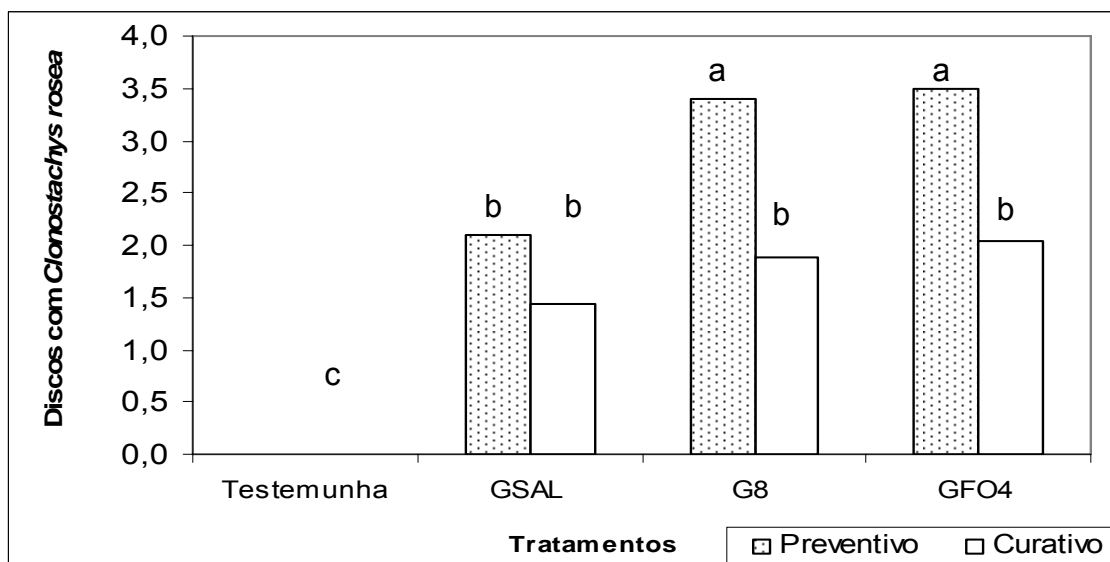


FIGURA 5. - Incidência de *Clonostachys rosea* em discos de folhas de fúcsia. Tratamentos: Testemunha - *Botrytis cinerea*; estirpes de *Clonostachys rosea* - GSAL, G8 e GFO4 - aplicadas antes (preventivo) ou depois (curativo) da inoculação com o patógeno. Média de 10 repetições com quatro discos. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan (5%). CV 19,27%. Porto Alegre, 2005.

CAPÍTULO IV

5. CONTROLE BIOLÓGICO DO MOFO CINZENTO (*Botrytis cinerea*) COM *Clonostachys rosea* EM CULTIVOS EXPERIMENTAL E COMERCIAL DE MUDAS DE FÚCSIA

5.1 INTRODUÇÃO

O Mofo Cinzento (MC), causado pelo fungo *Botrytis cinerea* (Pers. ex Fr.), afeta numerosas espécies de plantas, especialmente no sistema de cultivo protegido (Jarvis, 1989; University Illinois, 1997; Agrios, 2004). O cultivo de fúcsia (*Fuchsia speciosa* Hort.) em estufa, dependendo da variedade e das condições do ambiente, pode sofrer grandes perdas por MC. Os sintomas do do ataque de *B. cinerea* descritos em fúcsia incluem decoloração, amarelecimento e encharcamento dos tecidos, murcha, e necroses de folhas e ramos e até a morte das plantas (Time Warner Cable, 2003; Huelsman, 2004).

O manejo da doença é feito, fundamentalmente, com aplicações de fungicidas e práticas culturais visando a redução da infecção e da esporulação do patógeno (Jarvis, 1989; Hausbeck & Moorman, 1996; University Illinois, 1997). Os fungicidas utilizados pertencem aos grupos dos benzimidazóis, dicarboximidas, anilino pirimidinas e inibidores da síntese do ergosterol (Time

Warner Cable, 2003). O uso freqüente e inadequado desses produtos acarreta riscos à saúde humana (Vero & Mondino, 2002) e tem favorecido o surgimento de estirpes de *B. cinerea* resistentes aos fungicidas, causando a perda de eficácia do controle químico (Latorre et al., 1994; Ghini, 1996; Leroux et al., 1999; Latorre et al., 2002). No presente, o mercado consumidor de produtos agropecuários exige ausência ou o uso mínimo de resíduos de agrotóxicos, o que tem estimulado o uso de agentes de biocontrole para o manejo do MC.

O controle biológico é uma das estratégias alternativas ao uso de fungicidas, e vários fungos antagonistas, entre eles *Clonostachys rosea* (Link: Fr.) Schroers, Samuels, Seifert & W. Gams, têm sido citados por sua eficiência no controle do MC (Peng & Kevan, 1992; Zhang & Hopkin, 1996; Sutton et al., 1997; Valdebenito-Sanhueza et al., 1997; Köhl et al., 1998; Yu & Sutton, 1999; Sutton et al., 2002; Morandi et al., 2003; Li et al., 2004; Zamboni-Pinotti et al., 2005; Nobre et al., 2005).

Aplicações foliares de *C. rosea* têm sido efetivas na supressão da esporulação de *B. cinerea* em numerosos hospedeiros, tais como morangueiro (*Fragaria vesca* L.) (Sutton & Peng, 1993a), espécies florestais (Grigoletti et al., 2004) e ornamentais (Sutton et al., 1997; Köhl et al., 1998; Gerlagh et al., 2001; Morandi et al., 2003; Yohalem & Kristensen, 2004). Suspensões de esporos na concentração 10^6 conídios.mL⁻¹, aplicadas semanalmente em morangueiros cultivados em casa vegetação, e em folhas destacadas de morangueiros, framboeseiro (*Rubus idaeus* L.) e amoreira (*Rubus armeniacus* Focke) controlaram eficientemente o MC (Valdebenito-Sanhueza et al., 1997; Zamboni-Pinotti et al., 2005).

O número de aplicações de *C. rosea* necessárias para biocontrole do

MC varia segundo o patossistema. Em experimentos de cultivos comerciais de morangueiro, a utilização de três ou quatro aplicações por semana de suspensões de conídios (10^6 ou 10^7 .mL⁻¹) de *C. rosea* foram suficientes para reduzir a incidência de *B. cinerea* nas infrutescências da cultura (Sutton, 1994). Porém, no ciclâmen (*Cyclamen persicum* Mill.) em casa de vegetação, freqüências de aplicação de conídios de *Ulocladium atrum* Preuss. (1×10^6 mL⁻¹) e *C. rosea* (1×10^7 mL⁻¹), a cada duas ou três semanas, foram tão efetivas quanto as aplicações de fungicidas no controle do MC (Köhl et al., 1998).

O uso de antagonista nos ambientes protegidos aumenta a possibilidade de sucesso e de viabilidade econômica da aplicação do controle biológico por se tratar de áreas pequenas, com alta densidade de plantas, culturas de alto valor econômico e fatores climáticos mais estáveis (Paulitz & Belanger, 2001; Vida et al., 2004).

Esta pesquisa objetivou verificar a eficácia do controle biológico do MC com três estirpes de *C. rosea* em cultivo protegido da cv. 022 de fúcsia; comparar o desempenho de *C. rosea* aos fungicidas e determinar o período e freqüência de aplicação e impacto dos tratamentos nesta cultivar na fotossíntese líquida e na produção de mudas em cultivo comercial.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Descrição do local do ensaio

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da UFRGS, Porto Alegre, RS, a 10 m de altitude, e em casa de vegetação da empresa Agro-Industrial Lazzeri Ltda., Vacaria, RS, a 962 m de altitude, produtora de mudas de fúcsia.

Mudas de fúcsia cv. 022, com três semanas de idade, plantadas em vasos de 1 L, contendo substrato com argila expandida, foram colocadas em bancadas e cobertas com lona preta durante 14-16 h para permitir 8-10 h de luz diária. A temperatura e umidade relativa da casa de vegetação foram manualmente controladas e visou manter entre 20-23 °C e 60%, respectivamente no experimento comercial, porém foram registradas durante todo o período do experimento em Porto Alegre. As plantas foram irrigadas diariamente, fertilizadas, três vezes por semana, com 200 mL de NPK (20-20-20, 1 g.L⁻¹) e semanalmente eram feitas limpezas de ramos necrosados pela doença. Após 16-18 semanas, brotos de 2-3 cm de comprimento iniciaram a ser cortados e destinados a comercialização.

5.2.2 Obtenção das estirpes de *Clonostachys rosea*

As estirpes GSAL, G8 e GFO4 de *C. rosea*, provenientes de folhas de morangueiro, foram obtidas da coleção da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho (EMBRAPA-CNPUV) de Bento Gonçalves, RS (Figura 6). As mesmas foram mantidas em meio batata-dextrose-agar (BDA), a 24 °C e 12 h de luz (Dall'Onder, 1997).

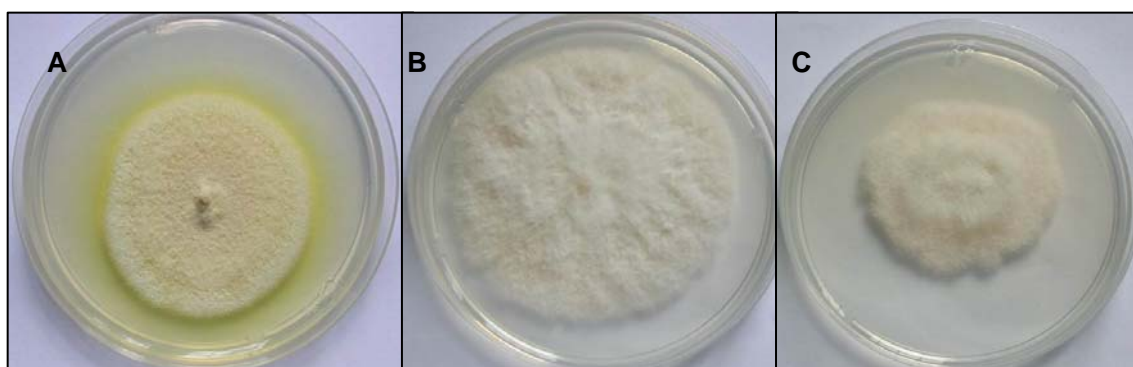


FIGURA 6. Colônias puras das estirpes GSAL (A), G8 (B) e GFO4 (C) de *Clonostachys rosea*, em placas de petri com batata-dextrose-ágar, isoladas de folhas de morangueiro da coleção EMBRAPA-CNPUV.

5.2.3 Produção de inóculo de *Clonostachys rosea*

O inóculo de *C. rosea*, constituído por conídios, foi produzido em meio BDA e em grãos de trigo. Para a obtenção dessas estruturas em meio de cultura, os isolados GSAL, G8 e GFO4 foram cultivados em BDA a 24 °C e 12 h de luz e incubados por 8-10 dias. Três suspensões foram preparadas com água destilada esterilizada (ADE) e Tween 20 a 0,01%, ajustando-se a concentração em 10^6 conídios.mL⁻¹, utilizando uma câmara de Neubauer de acordo com método descrito anteriormente (Dall'Onder, 1997).

Os conídios de GFO4 também foram obtidos de cultivos em grãos de trigo, segundo o protocolo empregado pela Embrapa Uva e Vinho: grãos de trigo mantidos em água destilada por 6 h, fervidos por 15 min, drenados e

transferidos para frascos de 500 mL, de maneira a ocupar 20% do volume. Os frascos foram fechados com algodão, cobertos com papel alumínio e autoclavados durante 30 min à 121 °C. Os grãos foram inoculados com 5 mL de uma suspensão de 10^7 conídios.mL⁻¹ de *C. rosea*, homogeneizados por 30 s. Os frascos foram colocados na horizontal, perpendiculares à fonte de luz. Na parte central do papel alumínio, que cobre a tampa de algodão, foi feito um orifício de 1 cm², para facilitar trocas gasosas. Os frascos foram incubados a 24 °C e luz do dia de 20 W durante 23 dias. As suspensões de conídios utilizadas para pulverização do cultivo comercial foram geralmente preparadas agitando-se 0,4 g de grãos de trigo inoculados com a estirpe GFO4 em 1 L de água com espalhante adesivo a 0,01% (Haiten, 200 g.L⁻¹).

5.2.4 Obtenção do isolado e produção do inóculo de *Botrytis cinerea*

O isolado de *B. cinerea* foi obtido de plantas de fúcsia cv. 022, cultivadas em casa vegetação da Empresa Agro-Industrial Lazzeri Ltda., Vacaria, RS. As colônias do patógeno foram mantidas em meio BDA à 24 °C e 12 h de luz.

As suspensões de conídios foram obtidas a partir de colônias com 10 dias de idade. Os conídios foram colhidos utilizando ADE com Tween 20 a 0,01%, ajustando-se a concentração a 10^5 conídios.mL⁻¹, utilizando uma câmara de Neubauer.

5.2.5 Experimento 1: Comparação do biocontrole do Mofo Cinzento exercido por três estirpes de *Clonostachys rosea*

Plantas de fúcsia cv. 022, com três semanas, foram plantadas na estufa do Departamento Fitossanidade, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS (Figura 7), e após 30 dias, aspergidas semanalmente com suspensões de conídios de três estirpes (GSAL; G8; GFO4) de *C. rosea* em ADE com 0,01% de Tween 20 coletados de culturas em BDA (10^6 .mL⁻¹), e ADE com 0,01% do epalhante (testemunha), durante 210 dias (junho-dezembro).

As aplicações foram realizadas no fim da tarde e as plantas foram mantidas em câmara úmida por 14 h após da inoculação. A temperatura e umidade relativa diárias, durante o período do experimento, foram registradas com termômetro de mercúrio de mínima e máxima (-10/+60 °C) (Incoterm) e higrômetro eletrônico (10-99%) (Hygrotherm).

Os tratamentos foram organizados em blocos casualizados com quatro repetições e seis vasos com três plantas por parcela experimental. O experimento foi conduzido nos ciclos 2004 e 2005.

Quatro folhas completamente expandidas foram destacadas de plantas de cada vaso do experimento, e inoculadas com suspensão de 10^5 conídios.mL⁻¹ de *B. cinerea*, para a comparação das estirpes de *C. rosea* e colocadas em câmara úmida por 72 h. A concentração do patógeno foi determinada como a mínima concentração de conídios capaz de produzir sintoma do MC a qual coincide com outros trabalhos de controle biológico (Sutton & Peng, 1993a; Yohalem, 2004; Nobre et al., 2005).



FIGURA 7. Vista das plantas de fúcsia cv. 022, no experimento 1, Departamento Fitossanidade, Faculdade de Agronomia, UFRGS. Porto Alegre, RS. 2004.

5.2.6 Experimento 2: Avaliação do biocontrole do Mofo Cinzento com a estirpe GFO4 de *Clonostachys rosea* no cultivo comercial de mudas de fúcsia cv. 022

Plantas de fúcsia cv. 022 estabelecidas na estufa da empresa Agro-Industrial Lazzeri Ltda., Vacaria, RS (Figura 8), durante abril-dezembro, foram submetidas a diferentes tratamentos: água + espalhante adesivo (Haiten), 0,01% (testemunha); aplicação semanal de fungicidas alternando os princípios ativos clorotalonil (1mL.L^{-1}), folpet (1 g.L^{-1}), oxicloreto de cobre (1 g.L^{-1}), mancozeb (1 g.L^{-1}), iprodione (1 mL.L^{-1}), thiram ($1,5\text{ g.L}^{-1}$) a partir de 26 dias pós-transplântio; suspensão de conídios da estirpe GFO4 de *C. rosea*, aplicação semanal a partir dos 26 dias pós-transplântio, duas vezes por

semana a partir dos 172 dias da primeira aplicação; e suspensão de conídios de GFO4 a cada três semanas a partir dos 61 dias do transplântio, passando à semanal aos 110 dias e duas vezes por semana aos 198 dias após o transplântio. O inóculo de *B. cinerea* dependeu da ocorrência natural na estufa. No momento das pulverizações, barreiras foram colocadas para evitar a deriva dos produtos (Figura 9).

Os tratamentos foram organizados em blocos casualizados, com quatro repetições e 18 vasos por parcela com nove vasos centrais úteis, cada um com duas a três plantas. O experimento foi conduzido nos ciclos de 2004 e 2005.

No experimento da avaliação de plantas tratadas com GFO4 em cultura comercial, quatro folhas, completamente expandidas, foram coletadas de cada vaso das parcelas.

As folhas foram colocadas em temperatura de -20 °C por 20 min para a detecção de infecção latente. Logo as folhas foram desinfestadas (álcool 96%, 1 min; hipoclorito de sódio 2%, 2 min; AE) e secas com papel toalha. Discos de folha de 1,7 cm de diâmetro foram obtidos com um furador e transferidos a placas de Petri com Agar-Água e incubados durante 10 dias a 24 °C e 12 h de luz.



FIGURA 8. Vista das plantas de fúcsia cv. 022, experimento 2, Empresa Agro-Industrial Lazzeri Ltda., Vacaria, RS.



FIGURA 9. Barreira para evitar deriva dos produtos no momento da aplicação, Vacaria, RS.

5.2.7 Avaliação dos experimentos

Determinação da colonização dos discos de folhas pelo patógeno e antagonista

O número de discos com sintomas e sinais de *B. cinerea* (incidência) e sua área afetada (severidade) foram determinados. A severidade foi estimada em discos de folha que foram centralizados e setorizados em áreas menores para calcular a área (cm²) colonizada por *B. cinerea* (Figura 10). Para isso foi utilizado um microscópio estereoscópico (modelo Wild M5A) de ocular com retículo para possibilitar a setorização do disco. A incidência do antagonista foi determinada nos dois experimentos. As observações foram feitas em 24 folhas destacadas por parcela aos 160 e 190 dias pós-transplântio no experimento que comparou os isolados de *C. rosea*. No trabalho conduzido no plantio comercial de fúcsia, as mesmas avaliações foram feitas em 36 folhas destacadas por parcela experimental aos 145, 180, 210, 238, 258 dias pós-transplântio. As análises estatísticas foram realizadas pelo Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores (SANEST). Os dados de incidência e severidade foram transformados por raiz quadrada de $(x + 0,5)$, analisados como delineamento de blocos casualizados multifatorial. Os fatores utilizados foram tratamentos, datas de avaliação e blocos. Fez-se a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas por teste Duncan (5%).

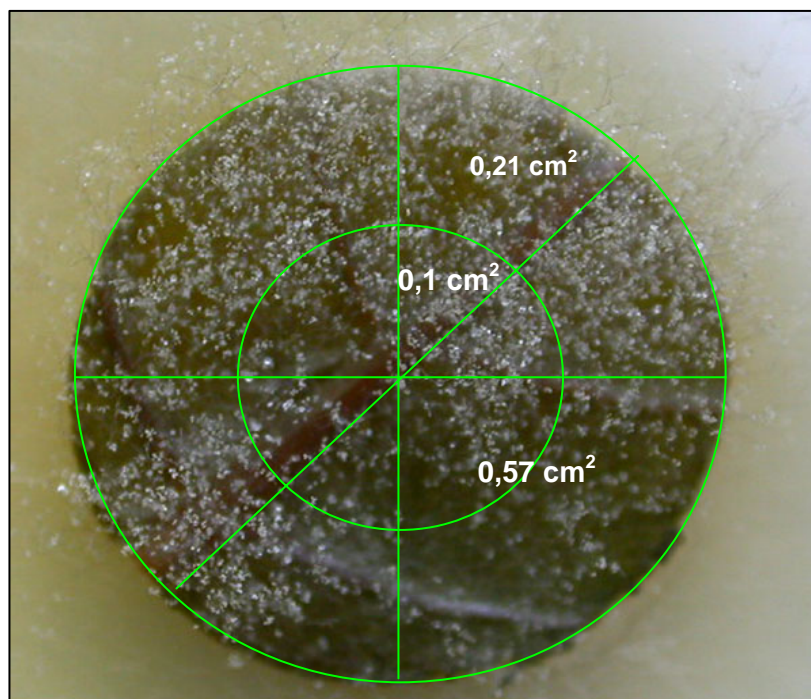


FIGURA 10. Divisão do disco de folha de fúcsia para o cálculo da área colonizada por *Botrytis cinerea*.

Produção de mudas por planta

A produtividade foi determinada através da contagem do número de mudas por planta de cada parcela experimental no cultivo comercial de fúcsia. Oito colheitas, desde 221 até 272 dias pós-transplante, e seis colheitas, desde 248 até 292 dias pós-transplante, foram feitas nos anos de 2004 e 2005, respectivamente.

Medição da fotossíntese

Amostras foram coletadas das parcelas e as medições de fotossíntese foram efetuadas pelos técnicos do laboratório de Fisiologia Vegetal da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, sobre a coordenação do Dr. Henrique P. Dos Santos, utilizando-se um medidor portátil de fotossíntese Li 6400 (Li Cor, Inc., Lincoln, USA), equipado com uma fonte artificial de radiação fotossinteticamente ativa (400-700nm). A amostragem das

plantas foi feita no final das avaliações (258 dias pós-transplante), coletando-se duas e três plantas por parcela experimental para os anos de 2004 e 2005, respectivamente. As folhas foram selecionadas segundo a posição, avaliando-se a primeira folha localizada na terceira bifurcação do tronco a partir da linha do solo, sendo feitas cinco repetições em cada tratamento, sendo analisadas folhas totalmente expostas à luz solar, saudáveis e sem sinal de senescência de acordo ao método descrito por Santos & Buckeridge, 2004.

Em cada tratamento foi realizada uma curva de resposta fotossintética em relação à intensidade de luz (análises pontuais com intensidade de radiação fixa em $800 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

As medidas foram determinadas fotossíntese líquida ($\text{mmol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), em relação às variantes impostas pelos tratamentos.

A análise estatística foi realizada pelo Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores (SANEST). Os dados das variáveis foram analisados com um delineamento de blocos inteiramente casualizados multifatorial. Os fatores utilizados foram tratamentos e blocos. Os dados foram submetidos à ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste Duncan (5%).

Análise molecular de isolados de *Clonostachys rosea* obtidos em disco de folhas no experimento comercial

Isolados de *C. rosea* foram obtidos a partir dos discos de folhas de todos os tratamentos inclusive da testemunha não inoculada nos experimentos do ano 2004. Para determinar a identificação da estirpe que colonizava as folhas das plantas nos tratamentos, foram obtidos oito, 10 e 11 isolados originários de folhas tratadas com *C. rosea*, água e fungicidas,

respectivamente e foi feita a comparação da caracterização molecular da estirpe utilizada para os tratamentos das mudas (GFO4) e de outras duas estirpes da coleção CNPUV da Embrapa (GSAL, G8).

A análise molecular foi realizada no laboratório de Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, sobre a coordenação da Dra. Maria Cléria Valadares-Inglis.

O DNA dos isolados originários das folhas dos tratamentos e as estirpes GFO4, GSAL e G8 de *C. rosea* foram extraídos de micélio crescido em 100 mL de caldo batata-dextrose-nutritivo incubado por 120 h a 25 °C no escuro e submetido à agitação de 280 rpm durante três dias. O micélio obtido foi lavado três vezes com água destilada, secado com papel filtro, macerado em nitrogênio líquido e colocado em tubos de centrifuga de polipropileno (15 mL) com solução de extração 2X CTAB, agitados em vórtex e incubados por 35 min a 65 °C. Após foi adicionado 5 mL clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), agitou-se em vórtex até formar uma emulsão e centrifugou-se a 4400 rpm por 4 min. O sobrenadante foi extraído, adicionando-se 1/10 volume 10% CTAB e igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico e repetiu-se a extração com clorofórmio/álcool isoamílico. O sobrenadante foi transferido a tubos novos e adicionou-se igual volume de isopropanol, agitou-se suavemente 5X e observou-se o DNA precipitado. Centrifugou-se a 4400 rpm por 4 min e descartou-se o sobrenadante. Lavou-se o precipitado com 2 mL de etanol 70% e centrifugou-se a 4400 rpm por 5 min e descartou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o precipitado em 750 µL TE e 5 µL de RNase (10 mg.mL⁻¹) e incubou-se a 37 °C por uma hora. O DNA foi transferido a um tubo de microcentrifuga (1,5 mL) e adicionou-se 750 µL a 1:1 da mistura do tampão

fenol e clorofórmio. Agitou-se até formar uma emulsão. Centrifugou-se na microcentrífuga a 14.000 rpm por 10 min. Transferiu-se a fase aquosa para um tubo novo, evitando pegar o material da interfase e precipitou-se o DNA com 1/10 volume de NaCl 5M e igual volume de isopropanol. Centrifugou-se na microcentrífuga a 14.000 rpm por 5 min. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o precipitado com 500 µL de etanol (70%). Agitou-se duas vezes por um min e secou-se o precipitado deixando o tubo em câmara de fluxo laminar. Resuspendeu-se o DNA em 200 µL de TE e estimou-se a concentração do DNA em gel de agarose (1,5% usando lambda 10X) de acordo com método descrito por Romano, 1998.

As amostras de DNA de cada isolado foram amplificadas por RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). O oligonucleotídeo iniciador da seqüência B6 -5' TGCTCTGCCC 3', sintetizado pela Operon, foi empregado na PCR em um termociclador PTC-100 (MJ-Research). A reação ocorreu numa mistura de 25 µl do produto com 0,5 mM de cada dNTPs (Promega), 1,25 µl do primer, 0,3 µL *Taq* DNA polimerase (Finnzyme), 2,5 µl tampão fornecido para a enzima (11,1X Magic Buffer), MgCl₂ 0,75 µl e 1 µl da amostra DNA. As condições da amplificação tiveram uma desnaturação inicial de 94 °C/3 min, 94 °C/30 s, 35 °C/1 min, 72 °C/2 min, 30 s, seguido de 44 ciclos de 94 °C/30 s, e uma extensão final de 72 °C/10 min segundo método otimizado por de Ávila, trabalho não publicado, 2005. Os produtos das ampliações foram separados por eletroforese em gel TAE agarose 1,5%, corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta.

As amostras de DNA também foram comparadas com PCR-intron. O oligonucleotídeo iniciador LA1 (TACTAAC) foi usado na PCR em um

termociclador PTC-100 (MJ-Research). A reação ocorreu em uma mistura de 25 µl do produto com 0,5 mM de cada dNTPs (Promega), 1,25 µl do primer, 0,3 µL *Taq* DNA polimerase (Finnzyme), 2,5 µl tampão fornecido para a enzima (11,1X Magic Buffer), MgCl₂ 0,75 µl e 2 µl da amostra DNA, nas seguintes condições: 94 °C/3 min, 94 °C/30 s, 45 °C/2 min, 72 °C/1 min, 30 s, seguido de 40 ciclos desde 94 °C/30 s, e uma extensão final de 72 °C/5 min segundo método otimizado por de Inglis, trabalho não publicado, 2004. Os produtos das amplificações foram separados por eletroforese em gel TAE agarose 1,5%, corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta. Na avaliação foram comparadas as bandas obtidas nas análises.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Comparação do biocontrole do Mofo Cinzento exercido por três estirpes de *Clonostachys rosea*

Em 2004, a incidência de MC em plantas tratadas com as estirpes GFO4 e G8 de *C. rosea* foi menor do que na testemunha, mas não se detectou diferenças entre elas (Figura 11). As plantas tratadas com GSAL apresentaram incidência intermediária do MC, não apresentando diferença das tratadas com GFO4 e G8 nem da testemunha. A proporção de discos com *C. rosea* foi de 2,1, 50,0 e 54,0% para as plantas dos tratamentos GSAL, G8, GFO4, respectivamente, sendo que GSAL não diferiu da testemunha. Na testemunha foi observada a presença de *C. rosea* (Figura 12).

Em 2005, as plantas tratadas com as três estirpes apresentaram menor incidência do MC do que a testemunha (Figura 11). A proporção de discos de folha com *C. rosea* foi de 21, 66 e 62% para GSAL G8 e GFO4, respectivamente, sendo G8 e GFO4 maior do que GSAL (Figuras 12).

O controle do MC pelas estirpes GSAL, GFO4 e G8 de *C. rosea* observado em plantas de fúcsia nos anos 2004 e 2005 também foi constatado no framboeseiro e morangueiro. A estirpe GFO4 foi a de maior eficácia no morangueiro, framboeseiro, amoreira (Zamboni-Pinotti et al., 2005) foi também o que exerceu maior redução do MC em fúcsia, o que evidencia amplitude de

controle do MC em diferentes hospedeiros. Este fato se constitui em fator de vantagem para seu uso em escala comercial.

O número de discos colonizados pelas estirpes variou segundo o hospedeiro, sendo maior a GFO4 (30%) do que as G8 (20%) e GSAL (18%) em tecido de framboseiro, e não apresentaram diferenças em morangueiro (Zamboni-Pinotti et al., 2005). Esses resultados evidenciam a variabilidade do biocontrole entre as diferentes estirpes, provavelmente por diferentes demandas de nutrientes, temperatura, umidade, luminosidade, hospedeiro e idade fisiológica do tecido da planta (Nobre et al., 2005).

Em 2004, as temperaturas foram favoráveis para a germinação de esporos (>20 °C) apenas a partir de setembro até dezembro (Figura 13), mas em 2005 foram favoráveis desde junho até dezembro (Figura 14). A temperatura média foi mais alta em 2005 do que em 2004, pois foi usado calefação nesse último ano. Essas diferenças entre temperaturas talvez permitam explicar o maior número de discos com *C. rosea* no ano 2005 do que em 2004 (Figura 12). A germinação dos esporos de *C. rosea* é favorecida por água livre ou umidade relativa próxima à saturação e temperatura ótima na faixa de 24-33 °C (Köhl et al., 1999). Em plântulas de *Picea mariana*, sem água livre nas folhas, foram inoculadas suspensões de conídios e no período de sete dias observou-se que os conídios perdiam a capacidade de germinar (Sutton et al., 1997).

Existem evidências sobre a importância da temperatura na ação da atividade antagônica de *C. rosea* contra *B. cinerea*. Assim, *C. rosea* suprimiu a esporulação de *B. cinerea* à temperatura entre 20-30 °C em folhas de morangueiro, framboeseiro, ciclâmen, begônia (*Begonia x hiemalis* Fotsch.) e

gerânio (*Pelargonium* L.), porém a ação biocontroladora diminuiu a temperaturas menores de 15 °C (Sutton et al., 1997). Contudo, o fungo tem reduzido a esporulação de *B. cinerea* em folhas necróticas de morangueiro a temperaturas entre 10-25 °C (Sutton & Peng, 1993a).

A umidade relativa também afeta o biocontrole do MC por *C. rosea* incidendo no estabelecimento e crescimento do antagonista no tecido da planta. No feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) *C. rosea* foi utilizado para obter redução da esporulação de *B. cinerea*. Nesta condição a umidade relativa do ambiente afetou o biocontrole do MC o que foi efetivo quando atingiu 95-98% e não controlou com 93% de UR (Szandala & Backhouse, 2001). No experimento ora relatado a umidade relativa se manteve ao redor de 63-70% e 80-86% em 2004 e 2005, respectivamente. Nos dois anos do experimento a umidade não foi favorável a *C. rosea*, mas não limitou a colonização dos tecidos pelo antagonista, sugerindo que a diferença das estirpes utilizadas no feijoeiro, as estirpes utilizadas em fúcsia podem tolerar condições de menor umidade relativa.

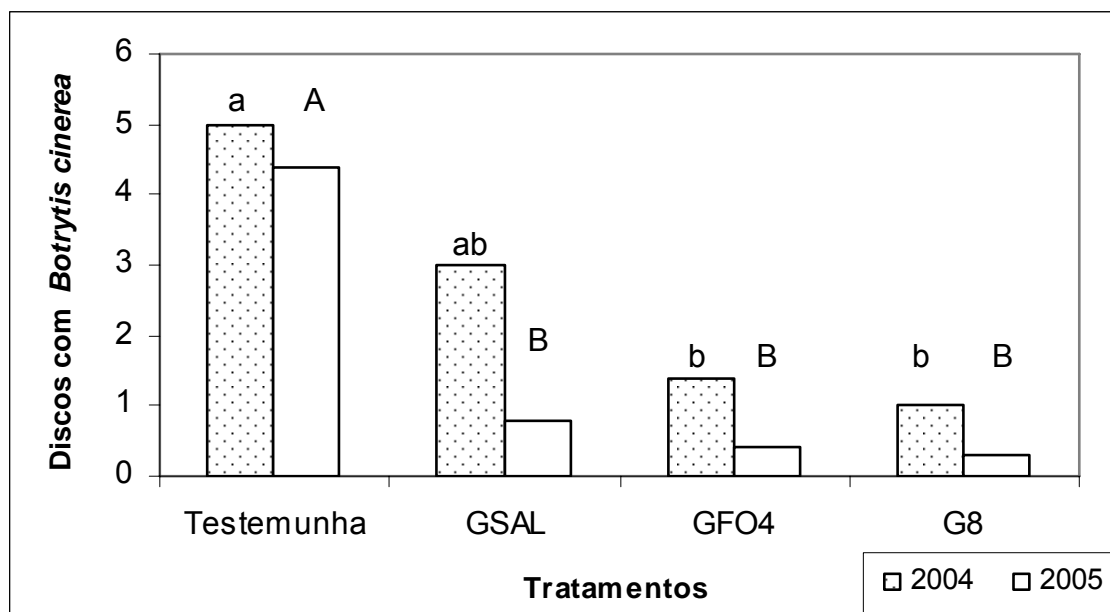


FIGURA 11. Incidência de *Botrytis cinerea* em discos de folhas de fúcsia. Média de quatro repetições com 24 discos, duas datas de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste Duncan (5%). CV = 36,76% (2004) e 36,12% (2005). Porto Alegre.

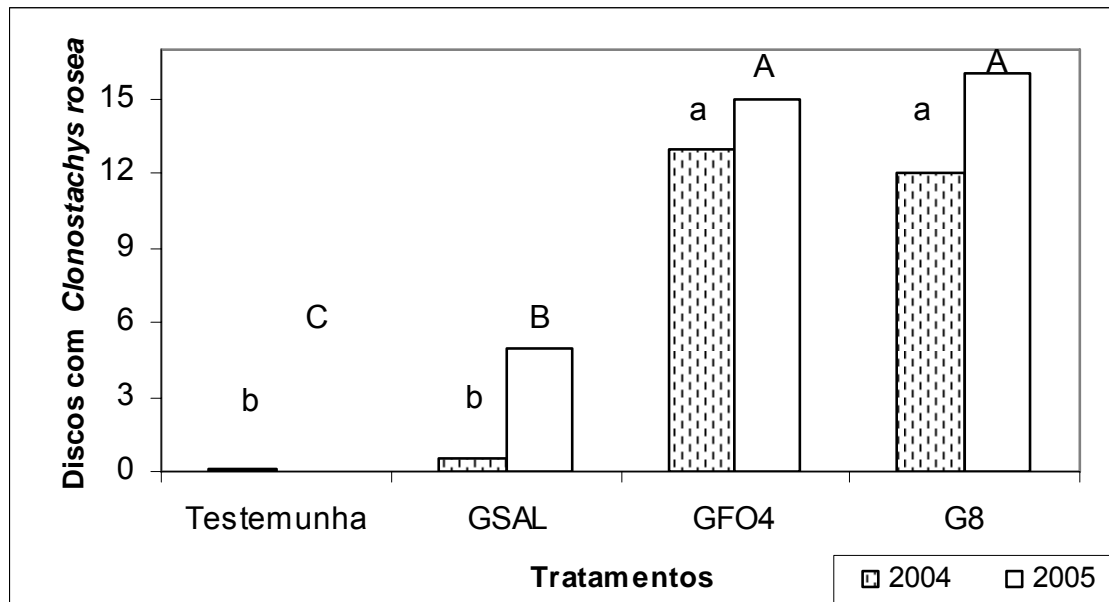


FIGURA 12. Incidência de *Clonostachys rosea* em discos de folhas de fúcsia. Média de quatro repetições com 24 discos, duas datas de avaliação. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste Duncan (5%), CV = 20,62% (2004) e 15,02% (2005). Porto Alegre.

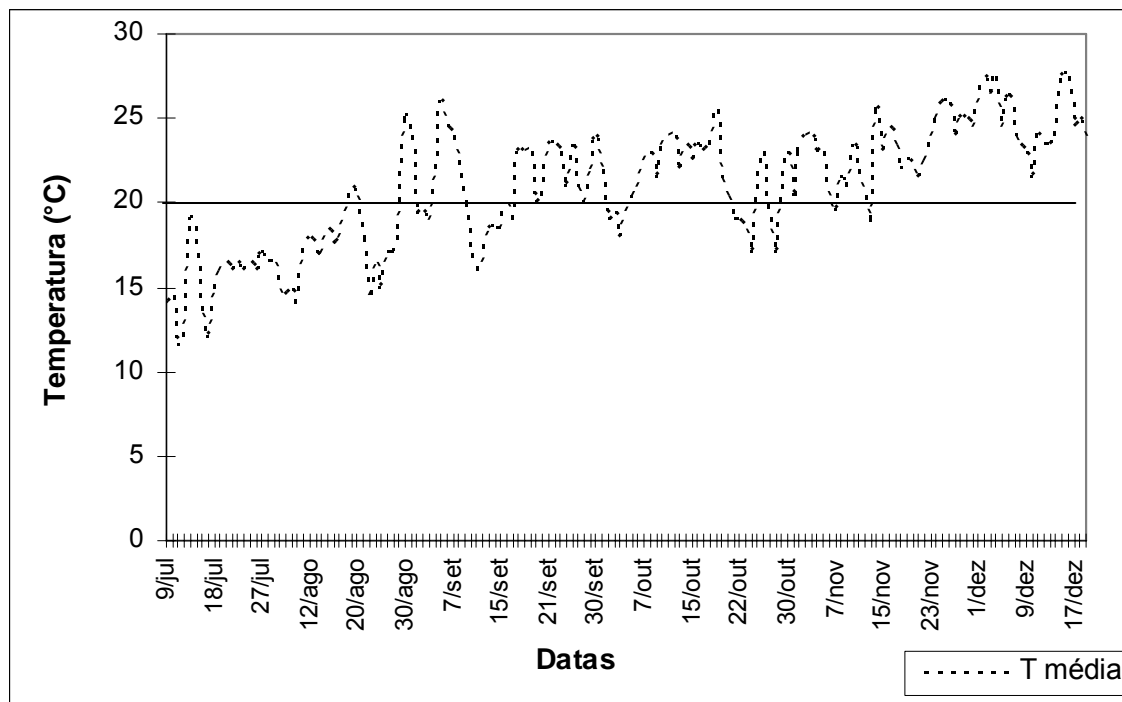


Figura 13. Temperatura média durante julho a dezembro. Linha entera marca temperatura a 20 °C. Porto Alegre, 2004.

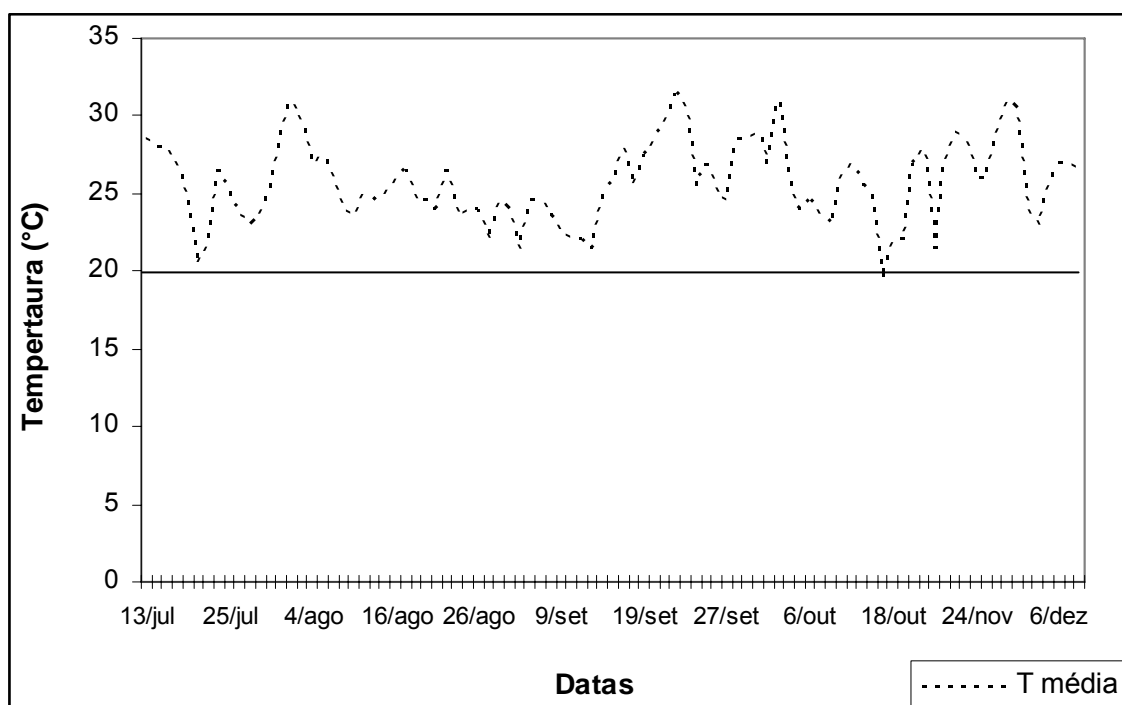


Figura 14. Temperatura média durante julho a dezembro. Linha entera marca temperatura a 20 °C. Porto Alegre, 2005.

A diferença de eficácia das estirpes de *C. rosea* no controle do MC

depende do estabelecimento nas folhas. Discos de folhas de roseira, morangueiro, eucalipto e tomateiro, tratados preventivamente com estirpes de *C. rosea*, variaram na porcentagem de colonização e redução da esporulação de *B. cinerea*. Treze estirpes de *C. rosea*, reduziram a esporulação de *B. cinerea* em folhas de roseira (81-97,4%), morangueiro (87,6-96,8%), eucaliptos (*Eucalyptus globulus* Labill.) (63,7-89,7%) e tomateiros (100%) (Nobre et al., 2005).

A concentração da suspensão de conídios do antagonista empregada no experimento foi de 10^6 conídios.mL⁻¹ sendo eficiente no controle do MC coincidendo com as concentrações aplicadas em trabalhos de *C. rosea* e *B. cinerea* em olerícolas e ornamentais (Sutton & Peng, 1993a; Zhang & Hopkin, 1996; Dall'Onder, 1997; Sutton et al., 1997; Valdebenito-Sanhueza et al., 1997; Köhl et al., 1998; Szandala & Backhouse, 2001; Morandi et al., 2001; Sutton et al., 2002; Nobre et al., 2005; Zamboni-Pinotti, 2005).

5.3.2 Avaliação do biocontrole do Mofo Cinzento com a estirpe GFO4 de *Clonostachys rosea* no cultivo comercial de mudas de fúcsia cv. 022

O tratamento de plantas com *C. rosea* reduziu a incidência e severidade do MC na cv. 022 a níveis similares das plantas tratadas com fungicidas, nos dois ciclos de avaliação. Em 2004, as plantas tratadas com a estirpe GFO4 e fungicidas apresentaram menor número de discos com *B. cinerea* quando comparados à testemunha, em todas as datas de avaliação. Foi verificada diferenças entre as tratadas 29 vezes com a estirpe GFO4 e fungicidas aos 180 e 258 dias pós-transplântio, datas onde a incidência do

patógeno foi maior do que as outras datas (Tabela 1). A severidade (área do disco com *B. cinerea*) do MC nas plantas tratadas com *C. rosea* e fungicidas foi significativamente menor que na testemunha desde a segunda data de avaliação (180 dias pós-transplante), não diferindo na primeira data. A maior severidade se apresentou para as datas de avaliação 180 e 258 dias nas plantas da testemunha e daquelas tratadas com 29 aplicações de GFO4, não diferindo nas dos fungicidas e as 39 aplicações de GFO4 (Tabela 2).

No segundo ano do experimento, as plantas tratadas 29 e 39 vezes com a estirpe GFO4 e as com fungicidas apresentaram menor número de discos e área afetada com *B. cinerea* do que a testemunha, não diferindo entre elas (Tabela 3). Nas duas últimas datas de avaliação os discos de folhas das plantas desses tratamentos não apresentaram o patógeno. Nos resultados de 2004 foi observada interação entre tratamentos e a data de avaliação. Contudo, em 2005 a interação não ocorreu. Essa diferença entre anos provavelmente seja devido às condições ambientais menos condúctivas ao desenvolvimento da doença em todo o período do cultivo em 2005 do que em 2004. Isto pode ocorrer visto que o ambiente da casa de vegetação teve manejo manual da ventilação e umidade, mas não da temperatura. É provável que a menor pressão de inóculo do patógeno neste sistema produtivo possa ter contribuído para a ocorrência de variação do controle do MC verificado nos dois anos de estudo.

Os resultados obtidos confirmam a viabilidade do uso do controle biológico do MC com *C. rosea* em cultura comercial de fúcsia e recomendam a substituição do controle químico por este método.

Em outros trabalhos, com *C. rosea* tem sido mostrado a eficiência de isolados desta espécie no controle do MC na produção comercial de outras

culturas como em morangueiros, framboeseiro, amoreira (Sutton & Peng, 1993a; Valdebenito-Sanhueza et al., 1997; Yu & Sutton, 1999; Zamboni-Pinotti, 2005), ciclâmen (Köhl et al., 1998) e em roseiras (Morandi et al., 2003).

Na comparação do período de proteção da cultura foi observado que pode ser iniciada a aplicação com *C. rosea* aos 61 dias de implantação do cultivo (29 aplicações), pois a incidência e severidade da doença neste tratamento foram semelhantes as plantas tratadas por um período mais extenso que iniciou aos 26 dias após o transplante (39 aplicações). A adoção desta estratégia de proteção é de importância, pois significou uma redução de 10 pulverizações (39-29). O critério de iniciar as aplicações do antagonista desde os primeiros estádios de crescimento das plantas, tem sido recomendado para favorecer a colonização de *C. rosea* antes do patógeno, mas isso pode variar em função da espécie hospedeira, a presença ou não da doença quando iniciados os tratamentos com o antagonista, o uso de práticas culturais e a epidemiologia da doença (Sutton et al., 1997). Nas roseiras, o início dos tratamentos com *C. rosea* em estádios avançados da epidemia e sem o uso de práticas de sanitização (*Rosa híbrida*), não se obteve redução da incidência do MC nas plantas tratadas com *C. rosea* quando comparadas com a testemunha (Morandi et al., 2003).

O manejo sanitário no sistema de produção de mudas de fúcsia baseia-se na desinfestação da casa de vegetação antes de iniciar um novo ciclo de produção. Isso permite supor que a fonte de inóculo primário de *B. cinerea* é a estaca enraizada contendo infecções latentes, progredindo na estação do crescimento. Portanto poderia-se diminuir o potencial inóculo primário do patógeno iniciando a pulverização com o antagonista no período da

formação da muda enraizada.

Trabalhos sobre a determinação do momento de início e a frequência de aplicação têm sido conduzidos em outros sistemas protegidos. Aplicações semanais de *C. rosea* em plantas de morangueiros, framboeseiro e amoreira têm sido efetivas no controle do MC (Zamboni-Pinotti, 2005). Aplicações, a cada 20 dias, de suspensões de conídios de *C. rosea* em plantas de ciclâmen foram tão efetivas quanto fungicidas no controle do MC (Köhl et al., 1998). Em plantas de roseira, somente uma aplicação de *U. atrum* reduziu a incidência e a severidade do MC. Contudo, obteve-se aumento do controle com maior número de aplicações (Yohalem & Kristensen, 2004).

O custo aproximado dos tratamentos para uma superfície de 900 m² foi de 3.485, 1.435 e 1.307 reais com as 32 pulverizações de fungicidas e 39 e 29 pulverizações com GFO4, respectivamente. A estimativa da produção de mudas de fúcsia é de 400.000 para uma estufa de 900 m² por ano, atingindo um montante de R\$ 182.400,00, sendo que os custos das pulverizações representam 1,9, 0,8 e 0,7% para os fungicidas e GFO4 (39 e 29 aplicações), respectivamente. A estimativa de custo da aplicação do antagonista foi baseada no preço de mercado de um produto comercial de *C. rosea* (CLONOSNAT) (Natural Rural, 2005).

Esses resultados evidenciam a possibilidade de diminuir a frequência de aplicações nos primeiros estádios de desenvolvimento de cada cultura e aumentá-la nos estádios mais avançados, otimizando o uso do biocontrole em fúcsia pela diminuição do custo da aplicação.

A colonização de *C. rosea* nos discos de folhas de fúcsia foi observada em todos os tratamentos mesmo que em níveis baixos quando

observadas as plantas com fungicidas e a testemunha o que sugere que a proteção utilizada para evitar a deriva não foi eficaz e não evitou o efeito de aerosol da aspersão (Tabela 4). A presença de *C. rosea* nas plantas não tratadas especificamente com o antagonista pode ter interferido na observação de diferenças maiores na incidência do MC entre os tratamentos.

Outrossim, a detecção de *C. rosea* nas plantas tratadas com fungicidas sugere uma possível tolerância do antagonista aos fungicidas utilizados o que poderia ser explorado futuramente se fosse de interesse a associação dos dois métodos de controle no Manejo integrado da doença.

TABELA 1. Incidência de *Botrytis cinerea* em discos de folhas de plantas de fúcsia tratadas com água, estirpe GFO4 de *Clonostachys rosea* e fungicidas. Vacaria, 2004.

| Tratamentos | Discos com <i>Botrytis cinerea</i> ⁽¹⁾ | | | | |
|--------------------------------------|---|----------|----------|----------|----------|
| | Avaliações (Dias pós-transplântio) | | | | |
| | 145 | 180 | 210 | 238 | 258 |
| Testemunha | a 5,0 C | a 20,0 A | a 11,0 B | a 7,0 BC | a 20,0 A |
| 29 aplicações de GFO4 ⁽²⁾ | b 0,0 B | b 8,6 A | b 0,3 B | b 0,2 B | b 4,2 B |
| 39 aplicações de GFO4 ⁽³⁾ | b 0,0 B | bc 4,5 A | b 0,9 AB | b 0,0 B | bc 2,3 A |
| Fungicidas | b 1,0 | c 2,0 | b 1,0 | b 0,3 | c 0,2 |

⁽¹⁾ Média de quatro repetições de 36 discos; ⁽²⁾ Aplicação a partir dos 61 dias do transplântio; ⁽³⁾ Aplicações a partir dos 26 dias pós-transplântio. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste Duncan (5%). Letras minúsculas representam diferença entre tratamentos. Letras maiúsculas representam diferenças entre datas. CV = 38%.

TABELA 2. Severidade de *Botrytis cinerea* em discos de folhas de plantas de fúcsia tratadas com água, estirpe GFO4 de *Clonostachys rosea* e fungicidas. Vacaria, 2004.

| Tratamentos | Severidade | | | | |
|-----------------------------------|--|-----------|-----------|------------|------------|
| | Área de discos com <i>Botrytis cinerea</i> (cm ²) ⁽¹⁾ | | | | |
| | Avaliações (Dias pós-transplântio) | | | | |
| | 145 | 180 | 210 | 238 | 258 |
| Testemunha | 0,110 C | a 0,670 A | a 0,400 B | a 0,230 BC | a 0,764 A |
| 29 | | | | | |
| aplicações de GFO4 ⁽²⁾ | 0,000 B | b 0,260A | b 0,040 B | b 0,004 B | b 0,085 AB |
| 39 | | | | | |
| aplicações de GFO4 ⁽³⁾ | 0,000 | b 0,110 | b 0,030 | b 0,000 | b 0,085 |
| Fungicidas | 0,030 | b 0,100 | b 0,020 | b 0,030 | b 0,004 |

⁽¹⁾ Média de quatro repetições de 36 discos; ⁽²⁾ Aplicação a partir dos 61 dias do transplântio; ⁽³⁾ Aplicação a partir dos 26 dias pós-transplântio. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste Duncan (5%). Letras minúsculas representam diferença entre tratamentos. Letras maiúsculas representam diferenças entre datas. CV = 9,72%.

TABELA 3. Incidência e severidade de *Botrytis cinerea* em discos de folhas de plantas de fúcsia tratadas com água, estirpe GFO4 de *Clonostachys rosea* e fungicidas. Vacaria, 2005.

| Tratamentos | Incidência | Severidade |
|--------------------------------------|---------------------------------|--|
| | Número de discos ⁽¹⁾ | Área de discos (cm ²) ⁽¹⁾ |
| Testemunha | 6,00 a | 0,20 a |
| 29 aplicações de GFO4 ⁽²⁾ | 0,70 b | 0,02 b |
| 39 aplicações de GFO4 ⁽³⁾ | 0,40 b | 0,02 b |
| Fungicidas | 0,50 b | 0,01 b |

⁽¹⁾ Média de quatro repetições de 36 discos, três datas de avaliação; ⁽²⁾ Aplicação a partir dos 61 dias do transplântio; ⁽³⁾ Aplicação a partir dos 26 dias pós-transplântio. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste Duncan (5%). CV = 38% (incidência) e 5,7% (severidade).

TABELA 4. Incidência de *Clonostachys rosea* em discos de folhas de plantas de fúcsia tratadas com água, estirpe GFO4 de *Clonostachys rosea* e fungicidas. Vacaria, 2004, 2005.

| Tratamentos | Incidência Número de discos ⁽¹⁾ 2004 | Incidência Número de discos ⁽²⁾ 2005 |
|---|--|--|
| 39 aplicações de GFO4 ⁽³⁾ | 18,65 a | 9,82 a |
| 29 aplicações de GFO4 ⁽⁴⁾ | 18,00 a | 4,61 b |
| Fungicidas | 2,56 b | 2,67 c |
| Testemunha | 1,60 b | 0,93 d |

⁽¹⁾ Média de quatro repetições de 36 discos, cinco datas de avaliação e ⁽²⁾ Média de quatro repetições de 36 discos três datas de avaliação; ⁽³⁾ Aplicação a partir dos 26 dias pós-transplântio; ⁽⁴⁾ Aplicação a partir dos 61 dias do transplântio. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste Duncan (5%). CV = 23% (2004) e 21% (2005).

5.3.3 Produção de mudas por planta e medição da fotossíntese

Em 2004, as plantas tratadas com *C. rosea* e as tratadas com fungicidas produziram números variáveis de mudas de qualidade comercial (Figura 15) e de taxa de fotossíntese (Figura 16). Contudo, não foi possível detectar diferenças entre tratamentos nas duas variáveis analisadas.

Em 2005, os tratamentos com a estirpe GFO4 de *C. rosea* e fungicidas produziram maior número de mudas por planta do que a testemunha, não diferindo entre eles (Figura 15). Em relação à taxa de fotossíntese líquida não se observaram diferenças (Figura 16). Os resultados obtidos confirmaram a redução da produção de mudas das plantas de fúcsia causada pelo MC, sem obter dados conclusivos em relação do efeito do antagonista nessas duas variáveis.

A variação entre o número de mudas por planta nos dois ciclos de cultivo poderia ser explicada pelas condições climáticas diferentes nos dois

anos do experimento as que podem produzir variação no vigor e crescimento das plantas.

Em estudos fisiológicos em plântulas de *Picea mariana*, a redução de *B. cinerea* por *C. rosea* impediu a redução da taxa de fotossíntese e da clorofila. Essa indução de alterações fisiológicas no hospedeiro provavelmente esteja mais associada à supressão da infecção e colonização do patógeno, do que uma ação direta do antagonista sobre a planta. Em plântulas sem o patógeno, *C. rosea* não alterou nenhum dos parâmetros anteriormente citados (Zhang et al., 1996).

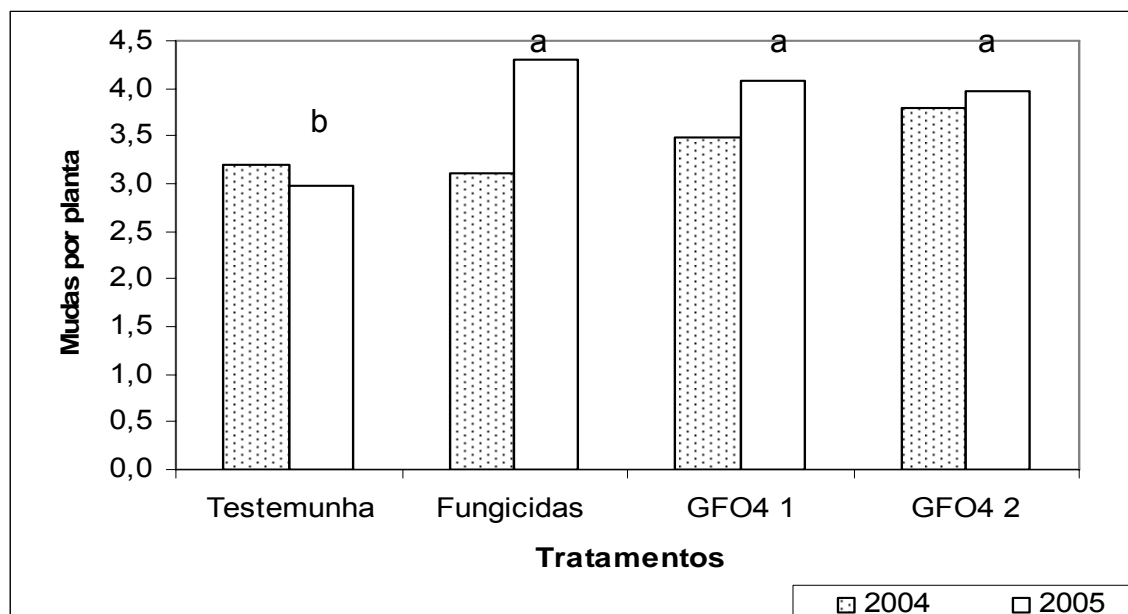


FIGURA 15. Número de mudas de fúcsia por planta. (GFO4 1) estirpe de *Clonostachys rosea* - 39 aplicações a partir dos 26 dias pós-transplântio; (GFO4 2) estirpe *C. rosea* - 29 aplicações a partir dos 61 dias do transplântio. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste Duncan (5%), CV = 6,7% (2004) e 10,53% (2005). Vacaria.

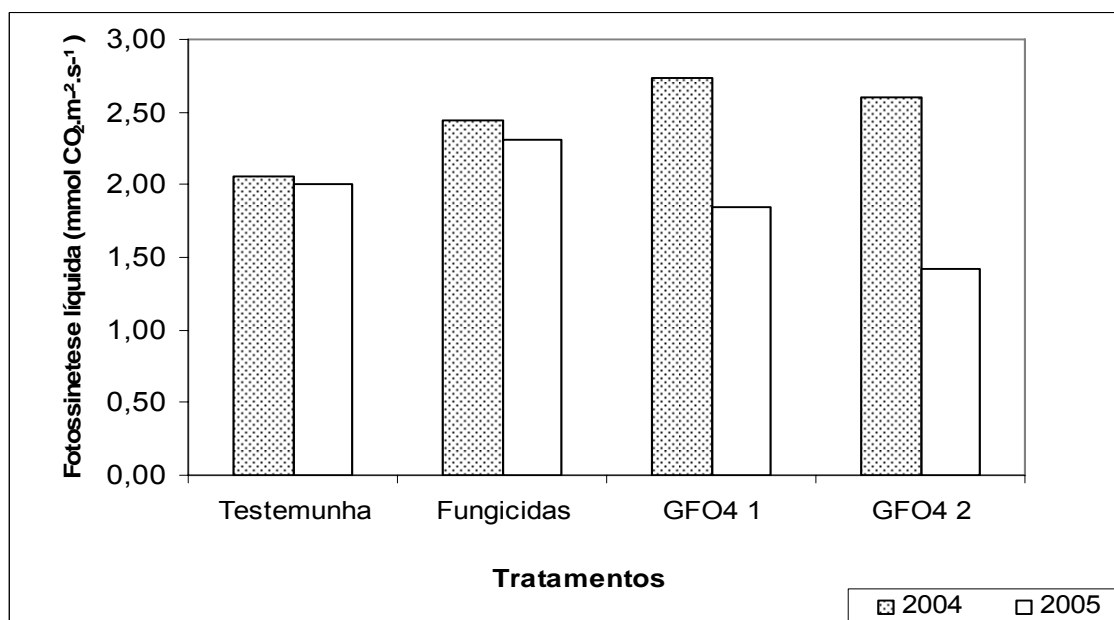


FIGURA 16. Fotossíntese líquida em plantas de fúcsia aos 298 (2004) e 277 dias pós-transplântio (2005). (GFO4 1) estirpe de *Clonostachys rosea* - 39 aplicações a partir dos 26 dias pós-transplântio; (GFO4 2) estirpe de *C. rosea* - 29 aplicações a partir dos 61 dias do transplântio. CV = 23% (2004) e 31% (2005). Vacaria.

Foi observado que as plantas tratadas com a estirpe GFO4 e com fungicidas apresentaram visualmente um maior vigor quando comparadas com a testemunha (Figura 17). Entretanto não foi detectada diferença significativa na fotossíntese (Figura 16). Essa constatação foi observada com frequência pelo consumidor, segundo comentários pelos técnicos da empresa Lazzeri, mas nesse caso as plantas com *C. rosea* eram maiores e mais verdes do que as tratadas com fungicidas. O maior vigor provavelmente se deva a supressão direta da doença por tratar-se de pulverização foliar e por não ter diferença com os fungicidas. A diferença do vigor não pode ser constatada pela medição da fotossíntese, sugerindo-se que no futuro sejam avaliados outros parâmetros para detectar ditas diferenças tais como a matéria seca e a altura de plantas. No cultivo pesquisado, as plantas de fúcsia eram destinadas a produção de mudas e, portanto, eram retirados os brotos novos constantemente o que impossibilitou medir altura ou matéria seca. Contudo, estima-se que a produção de mudas neste cultivo possa ser uma medida de promoção de crescimento.

Em outras espécies existem relatos da ação de *C. rosea* sobre a promoção de crescimento das plantas, mas quando o antagonista foi aplicado no solo em aveia (*Avena sativa* L.) e beterraba-açucareira (*Beta vulgaris* L.). *C. rosea* aumentou a atividade enzimática no solo, disponibilizando maior quantidade de nutrientes, produzindo aumento de matéria seca das plantas (Johansen, 2006). Outro efeito semelhante foi observado com outra estirpe de *C. rosea*, aplicada no substrato do sistema hidropônico, o que diminuiu a incidência da podridão da raiz (*Pythium* spp.) em pepineiro (*Cucumis sativus* L.) e promoveu vigor maior (Liu & Sutton, 2002). Entretanto, não existem relatos de promoção de crescimento quando o antagonista é aplicado na parte aérea.



FIGURA 17. Plantas de fúcsia cv. 022 dos tratamentos: (1) testemunha; (2) fungicidas; (3) 39 aplicações com GFO4; (4) 29 aplicações com GFO4. Vacaria, 2005.

Os resultados obtidos de dois anos de experimento confirmam a viabilidade do uso de *C. rosea* para o manejo do MC. Estudos posteriores poderão ser realizados quanto o otimizado da formulação, concentração, o início e a frequência de aplicação do antagonista. Avaliação de estirpes de *C. rosea* isoladas de fúcsia e outros nichos ecológicos poderão aumentar os níveis de controle do MC nesta cultura e talvez estimular a resistência dos hospedeiros a outras doenças dos cultivos.

Mesmo que no morangueiro as misturas de estirpes GSAL e GFO4 de *C. rosea* não foram mais eficazes do que aplicadas individualmente, misturas das estirpes GSAL, G8 e GFO4 e a otimização da dosagem e a frequência de aplicação poderão contribuir para melhorar o biocontrole do MC em culturas de fúcsia e em outras espécies de plantas.

Estudos sobre o modo de ação, das características fisiológicas e da sensibilidade aos fungicidas das estirpes de *C. rosea* mais eficazes deverão ser feitos para direcionar a seleção do biocontrolador.

5.3.4 Análise molecular de isolados de *Clonostachys rosea* obtidos em disco de folhas no experimento comercial

Os produtos amplificados das estirpes isoladas dos discos de fúcsia da testemunha, fungicidas e dos tratamentos com *C. rosea* apresentaram uma banda monomórfica de 2036 pb, presente na estirpe GFO4, usada nos tratamentos do cultivo comercial, e ausente nas estirpes GSAL e G8 (Figura 18). Também com o marcador intron o produto das estirpes apresentou uma banda monomórfica de 1018 pb, idêntica a GFO4 e ausente nas estirpes GSAL e G8 (Figura 19).

Os resultados das análises do DNA confirmaram que os isolados de *C. rosea* selecionados das amostras de cada tratamento eram todos da estirpe GFO4 que foi aplicada. Mesmo com estes dados, não deve ser descartada a ocorrência de estirpes de *C. rosea* não relatados neste cultivo, o que deveria ser estudado utilizando maior número de amostras que as utilizadas nesta ocasião.

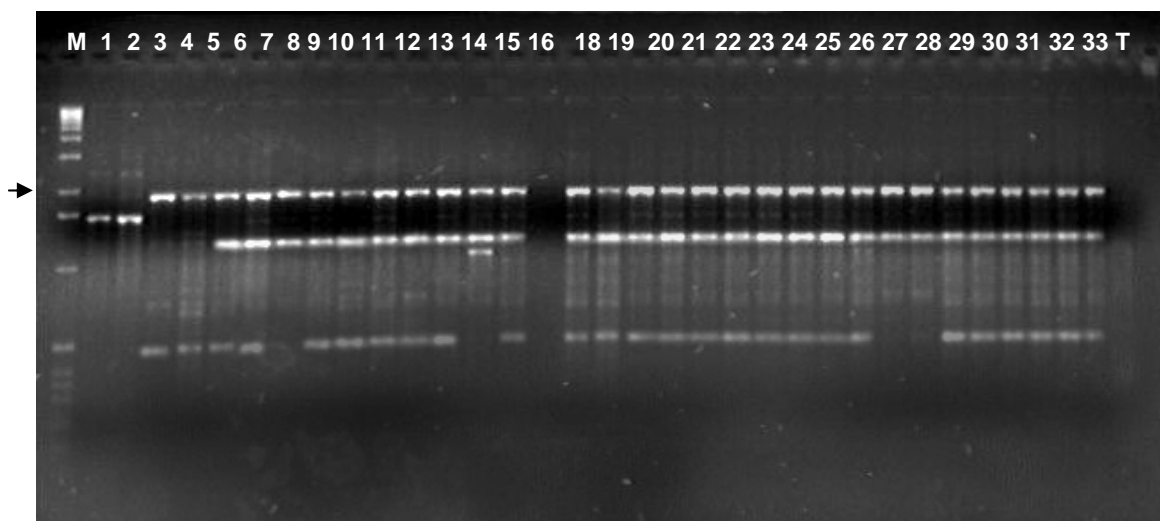


FIGURA 18. Produtos amplificados com oligonucleotídeo iniciador randômico das estirpes de *Clonostachys rosea*. 1:GSAL, 2:G8, 3: GFO4, 4 - 7: estirpes do tratamento 39 aplicações com GFO4 ; 8 -11: estirpes do tratamento 29 aplicações com GFO4; 12 - 23 estirpes do tratamento com fungicidas; 24 - 33 estirpes da testemunha. M: marcador 1kb T: Testemunha. Seta indica a banda de 2036 pb presente em GFO4 e em todas as estirpes isoladas dos tratamentos.

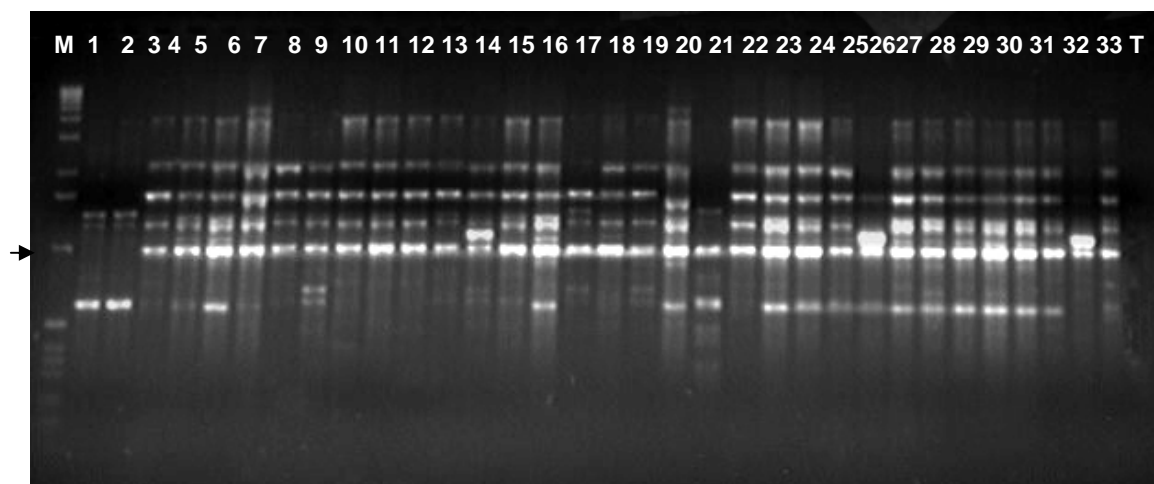


FIGURA 19. Produtos amplificados com oligonucleotídeo iniciador intron (LA1) das estirpes de *Clonostachys rosea*. 1:GSAL, 2:G8, 3: GFO4, 4 - 7: estirpes tratamento 39 aplicações com GFO4; 8 -11: estirpes do tratamento 29 aplicações com GFO4; 12 - 23 estirpes tratamento com fungicidas; 24 - 33 estirpes da testemunha. M: marcador 1kb. Seta indica uma banda de 1018 pb presente em GFO4 e em todas as estirpes isoladas dos tratamentos.

O marcador randômico e o intron, empregados na análise permitiram diferenciar as estirpes do experimento. O marcador randômico 5'-CTGACCAGCC (OPH-19), também permitiu diferenciar estirpes de *Trichoderma hamatum* em substrato comercial (Abbasi et al., 1999), assim como os marcadores intron (LA1, LA2, EI1 EI2), tem permitido identificar estirpes comerciais de *Saccharomyces cerevisiae* possibilitando a identificação e monitoramento de estirpes e o controle de qualidade de formulados comerciais (De Barros et al., 1996).

O uso da técnica relatada estabelece uma primeira contribuição para a caracterização de isolados de *C. rosea*. Em trabalhos futuros, os marcadores randômicos (B6 -5' TGCTCTGCCC 3') e intron (LA1 -TACTAAC) poderiam ser testados com outras estirpes de *C. rosea* para confirmar o polimorfismo encontrado e poder diferenciar indivíduos da espécie. Estudos de otimização da técnica molecular combinada com a técnica de diluição em placa poderão ser feitos para o controle de qualidade dos formulados de antagonista e o rastreamento de estirpes no ambiente.

6. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos nas condições em que esta pesquisa foi conduzida, concluiu-se o seguinte:

1. O método de congelamento de tecidos permite substituir o tratamento com paraquat para a detecção de infecções latentes de *Botrytis cinerea* em tecidos de fúcsia.
2. O controle do Mofo Cinzento com *Clonostachys rosea* é mais eficiente quando é aplicado preventivamente.
3. As estirpes GFO4, G8 e GSAL de *C. rosea* podem ser utilizados no controle do MC em fúcsia.
4. O tratamento de plantas de fúcsia com *C. rosea* é tão eficiente no controle do MC quanto o tratamento com fungicidas.
5. As aplicações de *C. rosea* em mudas de fúcsia, visando o controle do MC, podem ser iniciadas aos dois meses após o transplântio, com aplicações a cada três semanas, passando a semanal após quatro meses e duas vezes por semana após o sétimo mês.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABBASI, P.A.; MILLER, S.A.; MEULIA, T. et al. Precise detection and tracing of *Trichoderma hamatum* 382 in compost-amended potting mixes by using molecular markers. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n.12, p.5421-5426, 1999.

ADASKAVEG, J.E.; FÖRSTER, H.; THOMPSON, D.F. Identification and etiology of visible quiescent infections of *Monilinia fructicola* and *Botrytis cinerea* in sweet cherry fruit. **Plant Disease**, St. Paul, v.84, n.3, p.328-333, 2000.

AGRIOS, G. **Plant pathology**. San Diego: Academic Press, 2004. 922p.

ALHEETI, M.B.; SINCLAIR, J.B. Inhibition of *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* zoosporogenesis by *Gliocladium roseum*, *Trichoderma harzianum* and *Trichothecium roseum* culture filtrates. **Phytopathology**, St Paul, v.74, n.7, p.807, 1984.

BARNETT, H.L.; LILLY, V.G. A destructive mycoparasite, *Gliocladium roseum*. **Mycologia**, New York, v.54, n.1, p.72-77, 1962.

BENITO, E.P.; ARRANZ, M.; ESLAVA, A. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. **Revista Iberoamericana de Micología**, Salamanca, v.17, S43-S46, 2000.

BETTIOL, W. Biological control of plant pathogens in Brazil: Application and current research. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v.12, n.5, p.505-510, 1996.

BETTIOL, W. Biocontrole na filosfera: problemas e perspectivas. In: EMBRAPA/CNPDA (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Brasília: 1991. p.59-97.

BIELIKOVÁ, L.; LANDA, Z.; OSBORNE, L.S. et al. Characterization and identification of entomopathogenic and mycoparasitic fungi using RAPD-PCR technique. **Plant Protection Science**, Czech Republic, v.38, n.1, p.1-12, 2002.

BIGGS, S.R. Detection of latent infections in apple fruit with paraquat. **Plant Disease**, St. Paul, v.79, n.9, p.1062-1067, 1995.

BRANDÃO, G.L.; LIMA DA COSTA, A.B.; FERRES, L.L. et al. Randomly amplified polymorphic DNA of *Trichoderma* isolates and antagonism against *Rhizoctonia solani*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba,

v.45, n.2, p.151-160, 2002.

BRAUN, P.G.; SUTTON, J.C. Inoculum source of *Botrytis cinerea* in fruit rot of strawberry in Ontario. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v.9, n.1, p.1-5, 1987.

BULAT, S.A.; LÜBECK, M.; ALEKHINA, I.A. et al. Identification of a universally primed-PCR-derived sequence-characterized amplified region marker for an antagonistic strain of *Clonostachys rosea* and development of a strain-specific PCR detection assay. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.11, p.4758-4763, 2000.

BULAT, S.A.; LÜBECK, M.; MIRONENKO, N. et al. UP-PCR analysis and ITS1 ribotyping of strains of *Trichoderma* and *Gliocladium*. **Mycological Research**, Cambridge, v.102, n.8, p.933-943, 1998.

CHAVES, N.; WANG, A. Combate del moho gris (*Botrytis cinerea*) de la fresa mediante *Gliocladium roseum*. **Agronomía Costarricense**, San José, v.28, n.2, p.73-85, 2004.

DA LUZ, W.C. Classificação dos seres vivos para o novo milênio. Part I - O sistema de 25 reinos e três domínios. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, RS, v.8, p.1-25, 2000.

DALL'ONDER, G. **Produção e eficiência de conídios e biomassa de *Gliocladium roseum* no controle de *Botrytis cinerea* em morangueiro.** 1997. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Porto Alegre, 1997.

DE BARROS, L.M.; SODEN, A.; HENSCHKE, P.A. et al. PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.12, p.4514-4520, 1996.

DE MELO, I.S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.4, p.261-295, 1996.

DE MELO, I.S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: DE MELO, I.S.; DE AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariuna: Embrapa/CNPMA, 1998. p.17-67.

DODD, S.L.; HILL, R.A.; STEWART, A. A duplex-PCR bioassay to detect a *Trichoderma virens* biocontrol isolate in non-sterile soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, p.1-11, 2004.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.-H. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press, 1980. 859p. 1v.

ELAD, Y. Latent infection of *Botrytis cinerea* in rose flowers and combined chemical and physiological control of the disease. **Crop Protection**, Guildford, v.7, n.6, p.361-366, 1988.

ELAD, Y. Reduced sensitivity of *Botrytis cinerea* to two sterol biosynthesis-inhibiting fungicides: Fenetrazole and Fenetranil. **Plant Pathology**, Oxford, v.41, n.1, p.47-54, 1992.

ELAD, Y.; GULLINO, M.L.; SHTIENBERG, D. et al. Managing *Botrytis cinerea* on tomatoes in greenhouses in the Mediterranean. **Crop Protection**, Guildford, v.14, n.2, p.105-109, 1995.

ELAD, Y.; KOHL, J.; FOKKEMA, N.J. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic yeast. **Phytopathology**, St. Paul, v.84, n.10, p.1193-1200, 1994.

ELAD, Y.; VOLPIN, H. The involvement of ethylene and calcium in gray mold of pelargonium, Ruscus, and rose plants. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v.16, n.2, p.119-132, 1988.

ESSELN, S.; WELTZIEN, H.C. Endophytic fungi in the xylem of cuttings in different rooting substrates. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v.104, n.4, p.346-352, 1997.

EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK. **Paraquat**. Disponível em: <<http://extoxnet.orst.edu/pips/paraquat.htm>>. Acesso em: 20 dez. 2005.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220p.

FOKKEMA, N.J. Opportunities and problems of control of foliar pathogens with micro-organisms. **Pesticide Science**, Oxford, v.37, n.4, p.411-416, 1993.

GERLAGH, M.; AMSING, J.J.; MOLHOEK, W.M.L. et al. The effect of treatment with *Ulocladium atrum* on *Botrytis cinerea*-attack of geranium (*Pelargonium zonale*) stock plants and cuttings. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.107, n.4, p.377-386, 2001.

GHINI, R.E. Ocorrência de resistência a fungicidas em linhagens de *Botrytis cinerea*, no estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.21, n.2, p.285-288, 1996.

GINDRAT, D.; PEZET, R. Paraquat: A tool for the quick development of latent fungal infection and endophytic fungi. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.141, n.2, p.86-98, 1994.

GINDRAT, D.; VANDERHOEVEN, E.; MOODY, A.R. Control of *Phomopsis sclerotioides* with *Gliocladium roseum* or *Trichoderma*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v.83, suplemento, p.429-438, 1977.

GRIGOLETTI, A.; MAZUR, R.; GARCIA, C. Uso de *Gliocladium roseum* no controle de *Botrytis cinerea* em *Eucalyptus benthamii*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, suplemento, p.324, 2004. Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 27, 2004, Gramado, RS.

HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. ***Trichoderma and Gliocladium***: Enzymes, biological control and commercial applications. London: Taylor; Francis Ltd., 1998. 393p.

HARMAN, G.E.; LATORRE, B.; AGOSIN, E. et al. Biological and integrated control of botrytis bunch rot of grape using *Trichoderma* spp. **Biological Control**, Orlando, v.7, n.3, p.259-266, 1996.

HAUSBECK, M.K.; MOORMAN, G.W. Managing *Botrytis* in greenhouse-grown flower crops. **Plant Disease**, St. Paul, v.80, n.11, p.1212-1219, 1996.

HELBIG, J. Biological control of *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. in strawberry by *Paenibacillus polymyxa* (Isolate 18191). **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.149, n.5, p.265-273, 2001.

HJELJORD, L.; TRONSMO, A. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P. (Ed.) ***Trichoderma and Gliocladium***. London: Taylor; Francis Ltd.: 1998. p.131-151.

HOWELL, C.R. The role of antibiosis in biocontrol. In: HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P. (Ed.) ***Trichoderma and Gliocladium***: Enzymes, biological control and commercial applications. London: Taylor; Francis Ltd.: 1998. p.173-183.

HUELSMAN, M. **Crop Profile for *Fuchsia* in Ohio**. Disponível em: <<http://pestdata.ncsu.edu/CropProfiles/docs/ohfuchsia.html>>. Acesso em: 20 nov. 2004.

INGLIS, P.W.; RIGDEN, D.J.; MELLO, L.V. et al. Monomorphic subtelomeric DNA in the filamentous fungus, *Metarhizium anisopliae*, contains a RecQ helicase-like gene. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v.274, n.1, p.79-90, 2005.

INNOCENTI, G.; ROBERTI, R.; MONTANARI, M. et al. Efficacy of microorganisms antagonistic to *Rhizoctonia cerealis* and their cell wall degrading enzymatic activities. **Mycological Research**, Cambridge, v.107, n.4, p.421-427, 2003.

JAMES, T.D.W. Biological control of botrytis leaf blight of onion by *Gliocladium roseum* applied as sprays and with fabric applicators. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.102, n.3, p.265-275, 1996.

JARVIS, W.R. Managing diseases in greenhouse crops. **Plant Disease**, St. Paul, v.73, n.3, p.190-194, 1989.

JENSEN, B.; KNUDSEN, I.M.B.; JENSEN, D.F. Biological seed treatment of cereals with fresh and long-term stored formulations of *Clonostachys rosea*: biocontrol efficacy against *Fusarium culmorum*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.106, n.3, p.233-242, 2000.

JENSEN, B.; KNUDSEN, I.M.B.; MADSEN, M. et al. Biopriming of infected

carrot seed with an antagonist, *Clonostachys rosea*, selected for control of seedborne *Alternaria* spp. **Phytopathology**, St. Paul, v.94, n.6, p.551-560, 2004.

JOHANSEN, A. A greenhouse study on the effects of a bacterial and a fungal biocontrol agent on the indigenous soil microbiota. In: WORKSHOP, HEALTH AND ENVIRONMENTAL RISKS BY THE USE OF ORGANISMS FOR BIOLOGICAL CONTROL OF PESTS AND DISEASES IN AGRICULTURE, 2004, Elsinore. Disponível em: <<http://www.centre-biological-control.dk/Abstract%20workshop%20DMU%20II.doc>>. Acesso em: 5 jan. 2006.

JUNQUEIRA, A.; DA SILVA, M. **Análise conjuntural das exportações de flores e plantas ornamentais do Brasil**. Disponível em: <ibraflor.com.br/release/ibraflor1.htm>. Acesso em: 15 aug. 2004.

KEINATH, A.P.; FRAVEL, D.R.; PAPAVIDAS, G.C. Potential of *Gliocladium roseum* for biocontrol of *Verticillium dahliae*. **Phytopathology**, St. Paul, v.81, n.6, p.644-648, 1991.

KELLER, M.; VIRET, O.; COLE, F.M. *Botrytis cinerea* infection in grape flowers: Defense reaction, latency, and disease expression. **Phytopathology**, St. Paul, v.93, n.2, p.316-322, 2003.

KÖHL, J.; GERLAGH, M.; DE HAAS, B.H. et al. Biological control of *Botrytis cinerea* in cyclamen with *Ulocladium atrum* and *Gliocladium roseum* under commercial growing conditions. **Phytopathology**, St. Paul, v.88, n.6, p.568-575, 1998.

KÖHL, J.; LOMBAERS-VAN DER PLAS, C.H.; MOLHOEK, W.M.L. et al. Competitive ability of the antagonists *Ulocladium atrum* and *Gliocladium roseum* at temperatures favourable for *Botrytis* spp. development. **Biocontrol**, Dordrecht, v.44, n.3, p.329-346, 1999.

KÖHL, J.; VANDERPLAS, C.H.; MOLHOEK, W.M.L. et al. Effect of interrupted leaf wetness periods on suppression of sporulation of *Botrytis allii* and *Botrytis cinerea* by antagonists on dead onion leaves. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.101, n.6, p.627-637, 1995.

KRAUSS, U.; SOBERNAIS, W. Biocontrol of cocoa pod diseases with mycoparasite mixtures. **Biological Control**, Orlando, v.22, n.2, p.149-158, 2001.

LAHOZ, E.; CONTILLO, R.; PORRONE, F. Induction of systemic resistance to *Erysiphe orontii* cast in tobacco by application on roots of an isolate of *Gliocladium roseum* Bainier. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.152, n.8-9, p.465-470, 2004.

LAMONDIA, J.A.; DOUGLAS, S.M. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from Connecticut greenhouses to benzimidazole and dicarboximide fungicides. **Plant Disease**, St. Paul, v.81, n.7, p.729-732, 1997.

LATHA, J.; VERMA, A.; MUKHERJEE, P.K. PCR-fingerprinting of some *Trichoderma* isolates from two Indian type culture collections - a need for re-identification of these economically important fungi. **Current Science**, Bangalore, v.83, n.4, p.372-374, 2002.

LATORRE, B.A.; AGOSIN, E.; SAN MARTÍN, R. et al. Effectiveness of conidia of *Trichoderma harzianum* produced by liquid fomentation against *Botrytis* bunch rot table grape in Chile. **Crop Protection**, Guildford, v.16, n.3, p.209-214, 1997.

LATORRE, B.A.; FLORES, V.; SARA, A. et al. Dicarboximide resistant isolates of *Botrytis cinerea* from table grapes in Chile: Survey and characterization. **Plant Disease**, St Paul, v.78, n.10, p.990-994, 1994.

LATORRE, B.A.; SPADARO, I.; RIOJAS. Occurrence of resistant strains of *Botrytis cinerea* to anilinopyrimidine fungicides in table grapes in Chile. **Crop Protection**, Guildford, v.21, n.10, p.957-961, 2002.

LEROUX, P.; CHANPELAND, F.; DESBROSSES, D. et al. Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. **Crop Protection**, Guildford, v.18, n.10, p.687-697, 1999.

LI, G.Q.; HUANG, H.C.; ACHARYA, S.N. et al. Biological control of blossom blight of alfalfa caused by *Botrytis cinerea* under environmentally controlled and field conditions. **Plant Disease**, St. Paul, v.88, n.11, p.1246-1251, 2004.

LI, G.Q.; HUANG, H.C.; KOKKO, E.G. et al. Ultrastructural study of mycoparasitism of *Gliocladium roseum* on *Botrytis cinerea*. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v.43, n.3, p.211-218, 2002.

LI, J.; YANG, J.; HUANG, X. et al. Purification and characterization of an extracellular serine protease from a *Clonostachys rosea* and its potencial as a pathogenic factor. **Process Biochemistry**, London, 2005. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science>. Acesso em: 20 dez. 2005

LIM, T.K.; CHAN, L.G. Parasitism of *Phytophthora palmivora* by *Gliocladium roseum*. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v.93, n.5, p.509-514, 1986.

LIU, W.; SUTTON, J.C. **Effectiveness of microbial agents to protect Pythium root rot in hydroponic cucumber, 2002**. Disponível em: <http://199.86.26.61/online/BCTests/reports/2003/V023.pdf>. Acesso em: 5 jan. 2006.

LORENZI, H.; DE SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil: Arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 3. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1999. 1088p.

LÜBECK, M.; ALEKHINA, I.A.; LÜBECK, P.S. et al. Delineation of *Trichoderma harzianum* into two different genotypic groups by robust fingerprinting method, UP-PCR, and UP-PCR product cross-hybridization. **Mycological Research**, Cambridge, v.103, n.3, p.289-298, 1999.

MAMARABADI, M.; JENSEN, D.F.; LÜBECK, M. Identification of the role of chitinases from the antagonistic *Clonostachys rosea* strain IK726 in biocontrol. In: EUROPEAN CONFERENCE ON FUNGAL GENETICS 7, 2004, **Anais...** Disponível em: <<http://www.fgsc.net/ecfg7/PostersII/FungalPlantInteractions.pdf>>. Acesso em: 20 nov. 2005.

MCAFEE, B.J.; WSON-ANDOH, B.E.; CHAN, M. et al. Rapid extracellular enzyme assays for screening potential antisapstain biological control agents. **Wood and Fiber Science**, Madison, v.33, n.4, p.648-661, 2001.

MCNICOL, R.J.; WILLIAMSON, B.; YOUNG, K. Ethylene production by black currant flowers infected by *Botrytis cinerea*. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.262, p.209-386, 1989.

MERTELY, J.C.; LEGARD, D.E. Detection, isolation, and pathogenicity of *Colletotrichum* spp. from strawberry petioles. **Plant Disease**, St. Paul, v.88, n.4, p.407-412, 2004.

MICHEREFF, S. **Controle biológico de doenças de plantas**. Disponível em: <www.ufrpe.br:6789/fitopatologia/T17.pdf>. Acesso em: 15 sep. 2004.

MOLLER, K.; JENSEN, B.; ANDERSEN, H.P. et al. Biocontrol of *Pythium tracheiphilum* in chinese cabbage by *Clonostachys rosea* under field conditions. **Biocontrol Science and Technology**, Basingstoke, v.13, n.2, p.171-182, 2003.

MOODY, A.R.; GINDRAT, D. Biological control of cucumber black root-rot by *Gliocladium roseum*. **Phytopathology**, St. Paul, v.67, n.9, p.1159-1162, 1977.

MORANDI, M.A.B. **Influência de fatores bióticos e abióticos no estabelecimento de *Clonostachys rosea* em tecidos de roseira e controle biológico de *Botrytis cinerea* pelo antagonista em restos culturais**. 2001. 71 f. Tese (*Doctor Scientiae*) - Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

MORANDI, M.A.B.; MAFFIA, L.A. Effects of host and microbial factors on development of *Clonostachys rosea* and control of *Botrytis cinerea* in rose. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.106, n.5, p.439-448, 2000.

MORANDI, M.A.B.; MAFFIA, L.A.; MIZUBUTI, E.S.G. et al. Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: A valuable component in botrytis blight management in commercial greenhouses. **Biological Control**, Orlando, v.26, n.3, p.311-317, 2003.

MORANDI, M.A.B.; MAFFIA, L.A.; SUTTON, J.C. Development of *Clonostachys rosea* and interactions with *Botrytis cinerea* in rose leaves and residues. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v.29, n.2, p.103-113, 2001.

MOYANO, C.; GOMEZ, V.; MELGAREJO, P. Resistance to pyrimethanil and other fungicides in *Botrytis cinerea* populations collected on vegetable crops in

Spain. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.152, n.8-9, p.484-490, 2004.

MUELLER, J.D.; SINCLAIR, J.B. Association of *Gliocladium roseum* with soybeans in Illinois. **Phytopathology**, St. Paul, v.71, n.2, 244, 1981.

NATURAL RURAL. **Clonosnat**. Disponível em: <http://www.naturalrural.com.br/produtos/produtos_especificos.asp?titulo=Clonosnat%20PM&CodProduto=242>. Acesso em: 15 mar. 2005.

NOBRE, S.A.M.; MAFFIA, L.A.; MIZUBUTI, E.S.G. et al. Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. **Biological Control**, Orlando, v.34, n.2, p.132-143, 2005.

PAAVANEN-HUHTALA, S.; AVIKAINEN, H.; YLI-MATTILA, T. Development of strain-specific primers for strain of *Gliocladium catenulatum* used in biological control. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.106, n.2, p.187-198, 2000.

PAPAVIZAS, G.C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.23, p.23-54, 1985.

PAULITZ, T.C.; BELANGER, R.R. Biological control in greenhouse systems. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.39, p.103-133, 2001.

PENG, G.; KEVAN, P.G. Effectiveness of honey-bees for applying the biocontrol agent *Gliocladium roseum* to strawberry flowers to suppress *Botrytis cinerea*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v.14, n.2, p.117-129, 1992.

PENG, G.; SUTTON, J.C. Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v.13, n.3, p.247-257, 1991.

POLOMSKI, B. **Fuchsia**. Disponível em: <<http://hgic.clemson.edu/factsheets/HGIC1557.htm>>. Acesso em: 20 dez. 2005.

PRUSKY, D. Pathogen quiescence in postharvest diseases. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.34, p.413-434, 1996.

REHNER, S.A.; SAMUELS, G.J. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analyzed from nuclear large subunit ribosomal DNA-sequences. **Mycological Research**, Cambridge, v.98, n.6, p.625-634, 1994.

RHA, E.; PARK, H.J.; KIM, M.O. et al. Expression of exo-polygalacturonases in *Botrytis cinerea*. **Fems Microbiology Letters**, Amsterdam, v.201, n.1, p.105-109, 2006.

ROMANO, E. Extração de DNA de Tecidos Vegetais. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa SPI/Embrapa-Cenargen, 1998. p.163-177.

ROSSMAN, A.; MCKEMY, J.; PARDO-SCHULTHEISS, R. et al. Molecular studies of the *Bionectriaceae* using large subunit rDNA sequences. **Mycologia**, New York, v.93, n.1, p.100-110, 2001.

ROSSMAN, A.; SAMUELS, G.; ROGERSON, C. et al. Genera of *Bionectriaceae*, *Hipocreaceae* and *Nectriaceae* (Hypocreales, Ascomycetes). **Studies in Mycology**, Baarn, v.42, p.1-248, 1999.

SANTOS, H.P.; BUCKERIDGE, M.S. The role of the carbon of cotyledons in the establishment of seedlings of *Hymenaea courbaril* under different light conditions. **Annals of Botany**, London, v.94, n.6, p.819-830, 2004.

SCHROERS, H.J.; SAMUELS, G.J.; SEIFERT, K.A. et al. Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. **Mycologia**, New York, v.91, n.2, p.365-385, 1999.

SINCLAIR, J.B. Latent infection of soybean plants and seeds by fungi. **Plant Disease**, St. Paul, v.72, n.2, p.220-224, 1991.

SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E.L. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: HARMAN, G.E.; KIBICEK, C.P. (Ed.) **Trichoderma and Gliocladium**. London: Taylor; Francis Ltd., 1998. p.139-191.

SUGA, H.; OYABU, K.; ITO, M. et al. Detection of intron-like sequences in the small subunit rDNA 3' region of *Fusarium solani*. **Mycological Research**, New York, v.104, n.7, p.782-787, 2000.

SUTTON, J.C. Biological control of strawberry diseases. **Advances in strawberry research**, Ontario, v.13, p.1-12, 1994.

SUTTON, J.C.; LI, D.; PENG, G. et al. A versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. **Plant Disease**, St. Paul, v.81, n.4, p.316-328, 1997.

SUTTON, J.C.; LIU, W.; HUANG, R. et al. Ability of *Clonostachys rosea* to establish and suppress sporulation potential of *Botrytis cinerea* in defoliated stems of hydroponic greenhouse tomatoes. **Biocontrol Science and Technology**, Basingstoke, v.12, n.4, p.413-425, 2002.

SUTTON, J.C.; PENG, G. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. **Phytopathology**, St. Paul, v.83, n.6, p.615-621, 1993a.

SUTTON, J.C.; PENG, G. Manipulation and vectoring of biological organisms to manage foliage and fruit diseases in cropping systems. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.31, p.473-493, 1993b.

SZANDALA, E.S.; BACKHOUSE, D. Suppression of sporulation of *Botrytis cinerea* by antagonists applied after infection. **Australasian Plant Pathology**, Collingwood, v.30, n.2, p.165-170, 2001.

TIME WARNER CABLE. **Botrytis blight**. Disponível em:

<<http://www.rnews.com/print.cfm?id=9940>>. Acesso em: 20 nov. 2005.

TRINDADE, C. **Floricultura brasileira se expande no território mundial**. Disponível em: <<http://www.netmarinha.com.br/noticias.asp?Id=5874>>. Acesso em: 15 set. 2004.

UNIVERSITY ILLINOIS. **Report of plant disease: Botrytis blight or gray mold of ornamental plants**. Disponível em: <http://web.aces.uiuc.edu/vista/pdf_pubs/623.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2005.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; PERAZZOLO, I. Biocontrole de *Botrytis cinerea* em morangueiros cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, p.362-363, 1995.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; PERAZZOLO, I.; CZERMAINSKI, A.B.C. Controle Biológico de *Botrytis cinerea* em morangueiros cultivados em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, n.1, p.69-73, 1997.

VERO, S.; MONDINO, P. Control biológico de enfermedades de plantas. In: DOMÍNGUES, A.; PRIETO, R. (Ed.) **Perfil Ambiental del Uruguay**. Montevideo: Nordan, 2002. p.81-97.

VIDA, J.B.; ZAMBOLIM, L.; TESSMANN, J.D. et al. Manejo de doenças de plantas em cultivo protegido. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, n.4, p.355-372, 2004.

VOLPIN, H.; ELAD, Y. Influence of calcium nutrition on susceptibility of rose flowers to botrytis blight. **Phytopathology**, St. Paul, v.81, n.11, p.1390-1394, 1991.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J. et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, New York, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.

WILSON, M. Biocontrol of aerial plant diseases in agriculture and horticulture: current approaches and future prospects. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v.19, n.4, p.188-191, 1997.

WITTIG, H.P.P.; JOHNSON, K.B.; PSCHEIDT, J.W. Effect of epiphytic fungi on brown rot blossom blight and latent infections in sweet cherry. **Plant Disease**, St. Paul, v.81, n.4, p.383-387, 1997.

XUE, A.G. Biological control of pathogens causing root rot complex in field pea using *Clonostachys rosea* strain ACM941. **Phytopathology**, St. Paul, v.93, n.3, p.329-335, 2003.

YOHALEM, D.S. Evaluation of fungal antagonists for grey mould management in early growth of pot roses. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v.144, n.1, p.9-15, 2004.

YOHALEM, D.S.; KRISTENSEN, K. Optimization of timing and frequency of

application of the antagonist *Ulocladium atrum* for management of gray mold in potted rose under high disease pressure. **Biological Control**, Orlando, v.29, n.2, p.256-259, 2004.

YOHALEM, D.S.; NIELSEN, K.; GREEN, H. et al. Biocontrol agents efficiently inhibit sporulation of *Botrytis aclada* on necrotic leaf tips but spread to adjacent living tissue is not prevented. **Fems Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.47, n.3, p.297-303, 2004.

YOURMAN, L.F.; JEFFERS, S.N.; DEAN, R.A. Phenotype instability in *Botrytis cinerea* in the absence of benzimidazole and dicarboximide fungicides. **Phytopathology**, St. Paul, v.91, n.3, p.307-315, 2001.

YU, H.; SUTTON, J.C. Morphological development and interactions of *Gliocladium roseum* and *Botrytis cinerea* in raspberry. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v.19, n.3, p.237-246, 1997.

YU, H.; SUTTON, J.C. Effects of inoculum density, wetness duration, and temperature on control of *Botrytis cinerea* by *Gliocladium roseum* in raspberry. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v.20, n.3, p.243-252, 1998.

YU, H.; SUTTON, J.C. Density dynamics of *Gliocladium roseum* in relation to biological control of *Botrytis cinerea* in red raspberry. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v.21, n.1, p.23-32, 1999.

ZAHAVI, T.; COHEN, L.; WEISS, B. et al. Biological control of *Botrytis*, *Aspergillus* and *Rhizopus* rots on table and wine grapes in Israel. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.20, n.2, p.115-124, 2000.

ZAMBONI-PINOTTI, M.M. **Seleção de antagonistas para o controle de *Botrytis cinerea* em framboeseiro, amoreira e morangueiro**. 2005. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2005.

ZAMBONI-PINOTTI, M.M.; VALDEBENITO-SANHUENZA, R.M.; SILVA-RIBEIRO, R.T. Avaliação do efeito antagônico de isolados de *Clonostachys rosea* a *Botrytis cinerea* em folhas destacadas de morangueiro e framboeseiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA, 2.; SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE AGROECOLOGIA 5.; SEMINÁRIO ESTADUAL SOBRE AGROECOLOGIA 6., 2004, Porto Alegre. **Anais ...** Porto Alegre: EMATER, 2004. C749a. 1 CD-ROM.

ZAMBONI-PINOTTI, M.M.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; CAPALBO, D. et al. Antagonismo de *Clonostachys rosea* a *Botrytis cinerea* em folhas destacadas de morangueiro, framboeseiro e amoreira. **Summa Phytopathologica**, v. 31 suplemento, p.181, 2005. Trabalho apresentado, Congresso Paulista de Fitopatologia, 28, 2005, São Paulo, SP.

ZHANG, P.G.; HOPKIN, A.A. Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in container grown black spruce seedlings. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v.24, n.7, p.1312-1316, 1994.

ZHANG, P.G.; HOPKIN, A.A. Inoculum concentration and time of application of *Gliocladium roseum* in relation to biocontrol of *Botrytis cinerea* in black spruce seedlings. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v.26, n.3, p.360-367, 1996.

ZHANG, P.G.; TAN, W.; HOPKIN, A.A. *Gliocladium roseum* reduces physiological changes associated with infection of black spruce seedlings by *Botrytis cinerea*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v.18, n.1, p.7-13, 1996.