

LUCIANO VIANA COTA

Clonostachys rosea* em folhas de morangueiro: autoecologia e antagonismo a *Botrytis cinerea

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2004

LUCIANO VIANA COTA

Clonostachys rosea* em folhas de morangueiro: autoecologia e antagonismo a *Botrytis cinerea

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

APROVADA: 20 de fevereiro de 2004

Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti
(Conselheiro)

Prof. Acelino Couto Alfenas
(Conselheiro)

Prof. Sérgio Avelino Mota Nobre

Prof. Hudson Teixeira

Prof. Luiz Antonio Maffia
(Orientador)

A meus pais: Mario e Maria.
A meus Irmãos: Cláudio, Maria Lucilea,
Mario, Ana Claudia

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa.

Ao Prof. Luiz Antonio Maffia, pela dedicação, amizade e ensinamentos.

Ao Prof. Eduardo S. G. Mizubuti, pelo incentivo ao estudo da Fitopatologia, sugestões e críticas durante a realização deste trabalho.

Aos Prof. Acelino Couto Alfenas, Hudson Teixeira e Sérgio A. M. Mota (UNIMONTES) pelas sugestões e críticas.

Aos demais professores do departamento de fitopatologia, pelos ensinamentos durante o curso.

A todos os colegas da turma pelos momentos descontraídos e de estudos passados juntos.

Aos amigos de república Ratinho, Tiburga, Adriano, Paulinho, Antônio Carlos e Fábio, pelo convívio diário e momentos de descontração.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

LUCIANO VIANA COTA, filho de Mario Viana Cota e Maria Conceição Mota Viana, nasceu em 05 de maio de 1978, em Alvinópolis, Estado de Minas Gerais.

Em 1997, ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa (MG), onde graduou-se em maio de 2002.

Em abril do mesmo ano, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa (MG).

CONTEÚDO

	Página
Resumo	vi
Abstract	viii
Introdução Geral	1
CAPÍTULO 1	
Establishment of <i>Clonostachys rosea</i> isolates in strawberry leaves under different temperatures and humidity levels	
Resumo	4
Abstract	5
1. Introduction	6
2. Materials and Methods	7
3. Results	11
4. Discussion	13
5. References	15
CAPÍTULO 2	
Supressão da esporulação de <i>Botrytis cinerea</i> por isolados de <i>Clonostachys rosea</i> em folhas de morangueiro sob diferentes níveis de temperatura e umidade	
Resumo	26
Abstract	27
1. Introdução	28
2. Material e Métodos	30
3. Resultados	33
4. Discussão	37
5. Referências Bibliográficas	40
CAPÍTULO 3	
Dinâmica temporal de isolados de <i>Clonostachys rosea</i> em folhas de morangueiro e supressão da esporulação de <i>Botrytis cinerea</i> pelo antagonista	
Resumo	52
Abstract	53
1. Introdução	54
2. Material e Métodos	55
3. Resultados	60
4. Discussão	65
5. Referências Bibliográficas	68
CONCLUSÕES GERAIS	79

RESUMO

COTA, Luciano Viana, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2004.
***Clonostachys rosea* em folhas de morangueiro: autoecologia e antagonismo a *Botrytis cinerea*.** Orientador: Luiz Antonio Maffia. Conselheiros: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti e Acelino Couto Alfenas.

Em programa de pesquisa de manejo do mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea* (Bc), selecionaram-se quatro isolados de *Clonostachys rosea* (Cr). Em vista da não disponibilidade de informações, estudaram-se aspectos autoecológicos desses isolados e do PG 88-710 (proveniente do Canadá) em folhas de morangueiro. Quando aplicados em folhas, as quais foram submetidas a intervalos de 0 a 48h de câmara úmida após a aplicação, todos os isolados colonizaram as folhas. Os isolados sobreviveram em folhas e as colonizaram, quando submetidas à até 36h de ausência de molhamento foliar após a aplicação. A temperatura afetou o crescimento micelial em meio BDA e a colonização de discos foliares. A 10°C, os isolados cresceram pouco em BDA e não esporularam em discos foliares. O ótimo para crescimento em cultura e esporulação em discos foi em torno de 25°C. Em folhas previamente inoculadas com Bc e submetidas a intervalos de 0 a 36h de ausência de molhamento após a aplicação, todos os isolados reduziram a esporulação do patógeno, em níveis superiores a 93%. A redução da esporulação de Bc foi superior a 90% em folhas submetidas a intervalos de 0 a 48h de duração de câmara úmida, após a aplicação dos isolados. A 10°C nenhum isolado reduziu a esporulação do patógeno; a 15°C, a redução da esporulação variou de 37,1 a 72,3%; a 20°C, a redução foi superior a 85,7% e, a 25 e 30°C, Bc não esporulou. Quando aplicados antes do patógeno, em intervalos de 0 a 288h, os isolados reduziram de 47,3 a 97% da esporulação. Quando aplicados após o patógeno, nos mesmos intervalos, os isolados reduziram a esporulação, em níveis superiores a 95%. Em estudos de dinâmica temporal de isolados de Cr em plantas de morangueiro, durante 49 dias, os isolados de Cr sobreviveram durante todo o tempo em folhas ativas, porém houve redução da colonização foliar: 1 dia após a aplicação, a colonização foi de 16,3 a 18,3% e, aos 49 dias, foi de 3,9 a 5,5%. Em dois experimentos, avaliou-se a capacidade dos isolados em protegerem folhas da infecção por Bc. No

primeiro, a esporulação do patógeno reduziu-se em 52,3% e 9,7%, após 1 e 7 dias da aplicação dos isolados, respectivamente. Nos demais intervalos, os isolados não reduziram a esporulação do patógeno. No segundo experimento, a redução da esporulação de Bc foi de 62,6% e de 19,4%, após 1 e 49 dias da aplicação dos isolados, respectivamente. Os isolados de Cr obtidos em condições brasileiras foram tão eficientes quanto o PG 88-710 na colonização de folhas de morangueiro e no antagonismo a Bc.

ABSTRACT

COTA, Luciano Viana, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February 2004.
***Clonostachys rosea* in strawberry leaves: autoecology and antagonism to *Botrytis cinerea*.** Adviser: Luiz Antonio Maffia. Committee members: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti and Acelino Couto Alfenas.

In a research program aiming to manage diseases caused by *Botrytis cinerea* (Bc), four isolates of *Clonostachys rosea* (Cr) were selected. As little is known about these isolates, their autoecology and of PG 88-710 (from Canada) was studied on strawberry leaves. The isolates were applied on leaves, which stayed in moisture chamber on intervals varying from 0 to 48h, and leaf colonization was assessed. All five isolates colonized leaves, disregarding the interval of moisture chamber, and leaf colonization varied between 7.8 to 16.2%. The isolates were applied on leaves, which stayed until 36h without leaf wetness. Disregarding the delay in the time of moisture was established, the isolates survived and colonized the leaves (leaf colonization varied between 11.2 to 14.2%). Temperature affected both mycelial growth *in vitro* and leaf colonization. At 10°C, Cr isolates did not sporulate on strawberry leaf discs and grown poorly in PDA medium. The optimum temperature for mycelial growth and leaf colonization was around 25°C. Leaves inoculated with Bc, were sprayed with each isolate and were kept from 0 to 36 h without surface wetness. All five isolates reduced pathogen sporulation by more than 93%. On leaves that stayed in moisture chamber on intervals varying from 0 to 48h after application of the isolates, reduction of Bc sporulation was larger than 90%. At 10°C, all isolates did not reduce pathogen sporulation; at 15°C, reduction on pathogen sporulation varied from 37.1 to 72.3%; at 20°C, the reduction was larger than 85.7%; at 25 and 30°C Bc did not sporulate. Each isolate was applied on leaves either before or after Bc inoculation, at intervals ranging from 0 to 288h. For all application times before Bc inoculation, reduction of pathogen sporulation varied from 47.3 to 97.0%. For most application times after inoculation, reduction of pathogen sporulation was larger than 95.0%. Temporal dynamics of Cr isolates on strawberry was studied during 49 days. All four isolates survived in active leaves but leaf colonization decreased from 16.3-18.3% to 3.9-5.5% from 1 to 49 days after application. Each isolate was applied on leaves, Bc was inoculated after 1 to 49 days (treatments weekly spaced), and pathogen sporulation was evaluated. For experiment 1,

reduction of pathogen sporulation was 52.3% and 9.7%, 1 and 7 days after Cr application, respectively; Bc sporulation was not reduced at the other treatments. For experiment 2, reduction of pathogen sporulation was 62.6% and 19.4%, 1 and 49 days after antagonist application, respectively. The four isolates were similar to the PG 88-710 regarding leaf colonization efficiency and antagonistic capacity to Bc.

INTRODUÇÃO GERAL

Botrytis cinerea Pers.: Fr. é fungo necrotrófico, que causa severos danos em várias plantas cultivadas, principalmente em cultivo protegido (Jarvis, 1992). O controle das doenças causadas por *B. cinerea* é difícil, pois o patógeno pode infectar as plantas em quase todos os estádios de desenvolvimento, apresenta ampla gama de hospedeiro e provoca epidemias severas de progresso rápido (Gullino, 1992). O controle químico, amplamente utilizado, é dificultado pela variabilidade genética do patógeno, e é comum ocorrerem populações resistentes a fungicidas (Gullino, 1992; Yourman & Jeffers, 1999).

Entre as alternativas atualmente estudadas para manejo de *B. cinerea*, tem-se o controle biológico. Um dos antagonistas eficientes a *B. cinerea* é o fungo *Clonostachys rosea* (Link: Fr.) Schroers, Samuels, Siefert & Gams (Sutton *et al.*, 1997; Morandi *et al.*, 2003). Na UFV, em vários trabalhos objetivando o controle biológico de *B. cinerea*, comprovou-se a eficiência de o isolado Pg 88-710 de *C. rosea* (Peng & Sutton, 1991) em se estabelecer em roseira e suprimir a esporulação de *B. cinerea*. O isolado foi o mais eficiente, entre 52 microrganismos, em suprimir a esporulação de *B. cinerea* em restos de cultura de roseira (Tatagiba *et al.*, 1998). O antagonista sobreviveu por um mês em restos culturais de roseira, mantidos entre 10 e 30°C, foi pouco afetado pela ausência de período prolongado de molhamento foliar após aplicado (Morandi *et al.*, 2001), estabeleceu-se e suprimiu a esporulação do patógeno, independentemente do estágio de desenvolvimento dos tecidos de roseira (Morandi *et al.*, 2000). Em experimentos conduzidos em casa de vegetação, *C. rosea* estabeleceu-se e suprimiu a esporulação de *B. cinerea* nos restos culturais de roseira, em condições favoráveis ao patógeno (Morandi *et al.*, 2003).

O sucesso obtido no controle biológico de *B. cinerea* por *C. rosea* e a perspectiva de se obterem isolados do antagonista adaptados a ecossistemas brasileiros estimularam a busca por isolados nativos do Brasil para uso no biocontrole do patógeno. Nessa perspectiva, Nobre (2003) selecionou quatro isolados do antagonista, eficientes em suprimir a esporulação de *B. cinerea* em folhas de morangueiro, roseira e tomateiro. Nas últimas, ocorreu redução de 100% da esporulação do patógeno, aplicando-se 10^3 conídios do antagonista.mL⁻¹ (Nobre, 2003).

Os trabalhos relacionados à seleção foram realizados em condições ótimas para estabelecimento do antagonista, dificilmente encontradas no campo, e o entendimento da autoecologia desses isolados é importante para otimização do biocontrole de *B. cinerea*. Sabe-se, ainda, que *C. rosea* pode se estabelecer endofiticamente em tecidos verdes e tem vantagem competitiva sobre o patógeno, na colonização de restos culturais (Morandi et al., 2001). No entanto, para os isolados selecionados, esses aspectos ainda não são conhecidos e demandam maior compreensão.

Em vista do exposto, desenvolveu-se esse trabalho, com base nas hipóteses seguintes: i- Isolados de *C. rosea* obtidos em condições brasileiras têm requerimentos ecológicos diferentes dos do isolado Pg 88-710, obtido no Canadá; ii- A eficiência da supressão de esporulação de *B. cinerea* por isolados de *C. rosea* é influenciada pelo intervalo de aplicação dos isolados; e iii- Isolados do antagonista estabelecem-se em folhas ativas de morangueiro e são capazes de competir com *B. cinerea* nestas folhas. Organizou-se o trabalho em três capítulos: 1, no qual avaliou-se o efeito da temperatura e umidade no estabelecimento de isolados de *C. rosea* em folhas de morangueiro e o efeito da temperatura no crescimento micelial de isolados de *C. rosea* “in vitro”; 2, no qual avaliou-se o efeito da temperatura e umidade no antagonismo de isolados de *C. rosea* a *B. cinerea* em folhas de morangueiro; e 3, em que se estudou a dinâmica temporal de isolados de *C. rosea* em morangueiro, a capacidade de isolados de *C. rosea* em protegerem folhas de morangueiro da infecção por *B. cinerea* e a capacidade de isolados de *C. rosea*, em diferentes intervalos de aplicação, em suprimirem a esporulação de *B. cinerea*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Gullino, M.L. Chemical control of *Botrytis spp.* In: 10th International Botrytis Symposium, 1992, Heraklion, Crete, Greece. Proceedings. 10th International Botrytis Symposium: 1992. p. 217-22.

Jarvis, W.R. Managing diseases in greenhouse crops. Harrow: APS Press, 1992. 288 p.

Morandi, M.A.B., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G., Alfenas, A.C., Barbosa, J.G., 2003. Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: a

valuable component in *Botrytis* blight management in commercial greenhouses. *Biological Control* 26, 311-17.

Morandi, M.A.B., Maffia, L.A., Sutton, J.C., 2001. Development of *Clonostachys rosea* and interactions with *Botrytis cinerea* in rose leaves and residues. *Phytoparasitica* 29, 103-13.

Morandi, M.A.B., Sutton, J.C., Maffia, L.A., 2000. Effects of host and microbial factors on development of *Clonostachys rosea* and control of *Botrytis cinerea* in rose. *European Journal of Plant Pathology* 106, 439-48.

Nobre, S.A.M. Obtenção de isolados de *Clonostachys rosea* com potencial para biocontrole de *Botrytis cinerea*. Viçosa, MG: Universidade Federal Viçosa, 2003. 75 p. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal Viçosa, 2003.

Peng, G., Sutton, J.C., 1991. Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. *Canadian Journal of Plant Pathology* 13, 247-57.

Sutton, J.C., Li, D.W., Peng, G., Yu, H., Zhang, P., Valdebenito-Sanhueza, R.M., 1997. *Gliocladium roseum*: A versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Disease* 81, 316-28.

Tatagiba, J.S., Maffia, L.A., Barreto, R.W., Alfnas, A.C., Sutton, J.C., 1998. Biological control of *Botrytis cinerea* in residues and flowers of rose (*Rosa hybrida*). *Phytoparasitica* 26, 8-19.

Yourman, L.F., Jeffers, S.N., 1999. Resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in greenhouse isolates of *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 83, 569-75.

CAPÍTULO 1

Estabelecimento de isolados de *Clonostachys rosea* em folhas de morangueiro sob diferentes níveis de temperaturas e de umidade

Resumo

Clonostachys rosea (Cr) é fungo eficiente no controle biológico de *Botrytis cinerea* (Bc). Em programa de pesquisa para o manejo do mofo cinzento, selecionaram-se quatro isolados de Cr em ecossistemas brasileiros. Não há informação disponível sobre a autoecologia destes isolados. Assim, quantificou-se o efeito da temperatura e umidade no estabelecimento, dos quatro isolados e um obtido no Canadá (Pg 88-710), em folhas de morangueiro. Estudou-se, também, o efeito da temperatura no crescimento micelial dos quatro isolados em meio de cultura. Quando se aplicaram os isolados em folhas e essas foram submetidas a intervalos de 0 a 48h de câmara úmida após a aplicação, todos os isolados colonizaram as folhas, e a colonização variou de 7,8 a 16,2%. Quando aplicados em folhas e essas foram submetidas a intervalos de até 36h de ausência de molhamento foliar após a aplicação, os isolados sobreviveram nas folhas e as colonizaram, e a colonização variou de 11,2 a 14,2%. A temperatura afetou o crescimento micelial em meio BDA e a colonização de discos foliares. A 10°C, os isolados cresceram pouco em meio e não esporularam em discos de folha. O ótimo para crescimento micelial e esporulação dos isolados em discos foliares foi em torno de 25°C. Nas condições experimentais testadas, os isolados brasileiros de Cr foram tão ou mais eficientes que o isolado canadense na colonização de folhas de morangueiro.

Establishment of *Clonostachys rosea* isolates in strawberry leaves under different temperature and humidity levels

Abstract

Clonostachys rosea (Cr) is an efficient biocontrol agent of *Botrytis cinerea* (Bc). In a research program aiming to manage diseases caused by Bc, four isolates of Cr were gotten from Brazilian ecosystems. Little is known about the autoecology of these isolates. Therefore the effect of temperature and moisture on the establishment of the four isolates plus the PG 88-710 (from Canada) on strawberry leaves was quantified. Temperature effect on mycelial growth of the four isolates on culture medium was also evaluated. The isolates were applied on leaves, the leaves were kept in moisture chamber on intervals varying from 0 to 48h, and leaf colonization was assessed. All five isolates colonized leaves, disregarding the interval of moisture chamber, and leaf colonization varied between 7.8 to 16.2%. Each isolate was applied on leaves, which stayed up to 36 h without leaf wetness. Disregarding time delay in which moisture was established, all isolates survived and colonized the leaves, and leaf colonization varied between 11.2 to 14.2%. Temperature affected both mycelial growth on PDA and leaf colonization. At 10°C, *C. rosea* isolates poorly grown in PDA and did not sporulate on strawberry leaf discs. Optimum temperature for mycelial growth and leaf colonization was around 25°C. Brazilian isolates of Cr were as effective as or more effective than the isolate Pg 88-710 in colonizing strawberry leaves, under the tested experimental conditions.

1.Introduction

Botrytis cinerea Pers.: Fr. is a polyphagous fungus that causes severe losses in cultivated plants, mainly under greenhouse conditions (Jarvis, 1980, 1992). As the pathogen can infect crops in almost all developmental stages, has a wide host range, and commonly induces epidemics of high progress rates, its control is often difficult to achieve (Jarvis, 1980; Gullino, 1992). Chemical control is regularly used, but its efficacy is reduced because of the high genetic variability and the occurrence of fungicide-resistant pathogen populations (Pak et al., 1990; Gullino, 1992; Johnson et al., 1994; LaMondia & Douglas, 1997; Yourman & Jeffers, 1999; Yourman, et al., 2000). Other measures such as removal of plant debris and environment regulation have been used to control *B. cinerea* in crops (Jarvis, 1992; Monteiro, 1996), but they are complementary to other practices. Biological control is an effective component for pathogen management (Elad, 1996), and several antagonists to *B. cinerea* have been found.

Clonostachys rosea (Link: Fr.) Schroers, Samuels, Siefert & Gams (Schroers et al., 1999) is a promising antagonist to be used in *B. cinerea* management programs. *C. rosea* reduces *B. cinerea* growth and sporulation through hyperparasitism, nutrient competition, and competition for senescing and dead tissue colonization (Sutton et al., 1997; Yu & Sutton, 1997; Kohl & Fokkema, 1998; Morandi et al. 2001). The ability of *C. rosea* in establishing as endophytic is an important competitive advantage for the antagonist (Sutton et al., 1997; Yu & Sutton, 1997; Köhl & Fokkema, 1998; Morandi et al., 2001). The first studies on biocontrol of *B. cinerea* by *C. rosea* were carried out in Canada and the isolate Pg 88-710 was selected as a promising antagonist (Peng & Sutton, 1991). This isolate suppressed *B. cinerea* sporulation and controlled Botrytis blight in several hosts (Peng & sutton, 1991; Sutton & Peng, 1993; Valdebenito-Sanhueza, et al., 1997; Sutton et al., 1997; Sutton et al., 2002).

In experiments conducted at the Universidade Federal de Viçosa, Brazil, isolate Pg 88-710 controlled Botrytis blight on roses. Among 52 microorganisms, Pg 88-710 was the most effective in suppressing *B. cinerea* sporulation in rose crop debris (Tatagiba, et al., 1998). The antagonist survived throughout one month in rose crop debris in temperatures ranging from 10 to 30°C, and it was slightly affected by the lack of prolonged periods of

leaf wetness after being applied (Morandi et al., 2001). Regardless of developmental stages of rose tissues, *C. rosea* established and suppressed *B. cinerea* sporulation (Morandi et al., 2000) even under favorable conditions to the pathogen (Morandi et al., 2003), and both pathogen and antagonist had similar ecological requirements (Morandi et al., 2003).

The success of *B. cinerea* biocontrol with the Canadian isolate motivated the search for Brazilian isolates of *C. rosea*. Four selected *C. rosea* isolates from Brazil established in rose, strawberry, eucalyptus, and tomato leaves and suppressed *B. cinerea* sporulation in these leaves (Nobre, 2003). As in many other reports (Peng & Sutton, 1991; Elad et al., 1994; Tatagiba et al., 1998), the initial mass selection trials with Brazilian isolates of *C. rosea* were conducted under highly favorable conditions to the antagonist.

The environment affects the establishment, survival, and the activities of biocontrol agents (Elad et al., 1994; Hamush & Boland, 1996; Sutton et al., 1997; Shtienberg & Elad, 1997; Dick & Elad, 1999). The lack of efficiency when biocontrol agents are used in the field may be related to poor knowledge of ecological requirements. For example, *Trichoderma harzianum* T39 controlled cucumber gray mold more effectively when temperatures were above 20°C and relative humidity was low than when at low temperatures and high relative humidity (Elad & Zimand, 1993). Proper understanding of antagonist's ecological requirements in establishing and controlling a disease helps defining the rational basis to set strategies for introducing a biocontrol agent in an ecosystem. Thus, the objective of the present study was to quantify the influence of humidity and temperature in the establishment of Brazilian isolates of *C. rosea* in strawberry leaves.

2. Materials and Methods

2.1. General procedures

Strawberry plants (*Fragaria ananassa* L.) 'Dover' were cultivated in 20cm-diameter plastic pots filled with soil:cow manure:sand (11:4:1 w/w) substrate, previously disinfested with methyl bromide. Plants were kept in a temperature-controlled greenhouse (maximum 25°C) and fertilized every 60 days with 5g of 4-14-8 NPK per pot. Flower petals and old leaves were periodically removed to reduce the chances of *B. cinerea* infection. Only fully expanded 20 to 30-day old green leaves were used in the experiments.

In all experiments, four Brazilian isolates of *C. rosea* obtained from different ecosystems were used: NCR19/F, NCR60/F, NCR61/F, and NCR62/F. These isolates were selected based on their capacity to establish and suppress sporulation of *B. cinerea* in strawberry, tomato, rose, and eucalyptus leaves (Nobre, 2003). Isolate Pg 88-710 was included for comparative purposes. Conidia of each isolate were obtained from colonies grown in potato dextrose agar (PDA) at 25°C, under white light, 12h photoperiod. Conidia from 10 to 14-day old colonies that have passed through three successive transfers were suspended in sterile distilled water (SDW) supplemented with Tween 20 (0.05% v/v). Suspensions were filtered through double cheesecloth layer and concentration was adjusted with haemocytometer to 10^6 conidia.mL⁻¹.

Spore suspensions were sprayed on leaflets or leaf discs with a handheld DeVilbiss sprayer No. 15. To detect contaminations with *C. rosea* naturally present in strawberry phylloplane, an additional control treatment with leaflets sprayed with SDW supplemented with Tween 20 (0.05% v/v) was included in all experiments. Data from this treatment were not considered in the statistical analysis.

The establishment of *C. rosea* isolates was indirectly assessed by quantifying fungus sporulation on strawberry tissues. To quantify sporulation, leaf discs were transferred to 90-mm diameter Petri dishes containing paraquat-chloramphenicol-agar (PCA) (Peng & Sutton, 1991). After incubation at 20°C during 10-12 days, the percentage of disc area with *C. rosea* sporulation was assessed under a stereoscope. It was used a scale, in which grade 0= 0; 1= 0-3; 2= >3-6; 3= >6-12; 4= >12-25; 5= >25-37; 6 = >37-50, and 7 = more than 50% of colonized leaf disc area (Nobre, 2003). For statistical analysis values of each class were transformed to the average value of the corresponding percentage of colonized area range. For instance, if a disc was rated as 3, then its corresponding severity value was 9.0. Data from each repetition were the average of 15 leaf discs.

2.2. Establishment of *Clonostachys rosea* as affected by leaf wetness duration

The establishment of *C. rosea* in strawberry leaves after 0, 6, 12, 24, 36, and 48h of leaf wetness duration was quantified. Two leaflets were placed in a plastic box (11 width x 11 length x 3.5cm depth - gerbox) on a 2mm mesh-nylon screen placed above a 1cm-thick

foam sponge soaked with distilled water. *C. rosea* spore suspension was sprayed onto leaflets and gerbox were kept in growth chamber set at 20°C, 12h photoperiod. After each period of leaf wetness duration, leaflets were air dried during 30min and 1-cm diameter leaf discs were cut from the leaflets of each repetition. Leaf discs were transferred to PCA medium and antagonist colonization was quantified as described in 2.1.

The experiment was set in a completely randomized design in a factorial scheme with 6 humidity levels x 5 *C. rosea* isolates, and 3 repetitions (a gerbox with two leaflets = one repetition). The experiment was run twice.

2.3. Establishment of *Clonostachys rosea* when leaf wetness periods started at different times after antagonist application

The establishment of *C. rosea* in strawberry leaves when periods of leaf wetness started after 0, 2, 4, 8, 16, 24, or 36 hours after its application was quantified. Two leaflets were placed in a gerbox as described in 2.2., but the foam was dry. *C. rosea* spore suspension was sprayed onto leaflets and until the starting time of leaf wetness, gerbox were kept opened. To start leaf wetness period, distilled water was added to soak the lining foam and gerbox lid was closed. Gerbox were kept in growth chamber set at 20°C, 12h photoperiod. After 24h of leaf wetness, leaflets were air dried during 30min and leaf discs 1cm diameter were cut from leaflets of each repetition. Leaf discs were transferred to PCA medium and antagonist colonization was quantified as described in 2.1.

The experiment was set in a completely randomized design in a factorial scheme with 7 starting times of leaf wetness x 5 *C. rosea* isolates, and 3 repetitions (a gerbox with two leaflets = one repetition). The experiment was run twice.

2.4. Mycelial growth of *Clonostachys rosea* as affected by temperature

In vitro mycelial growth of *C. rosea* was quantified at 10, 15, 20, 25, and 30°C. Mycelial plugs (5mm diameter) were taken from actively growing colonies of *C. rosea* in PDA medium kept at 25°C. One plug was transferred to the center part of a Petri dish with PDA medium and plates were maintained in incubators set at 10, 15, 20, 25, or 30°C. Colony radial growth was measured with a ruler at every 4 days until one colony,

regardless of treatment, had reached the borders of the plate (normally after 19 days at 25°C). The area under colony growth curve (AUCGC) was calculated for each plate (Campbell & Madden, 1990) and was used as dependent variable in statistical analyses.

The experiment was set in a completely randomized design in a factorial scheme of 4 Brazilian *C. rosea* isolates x 5 temperature levels, and 5 repetitions (one plate= one repetition).

2.5. Establishment of *Clonostachys rosea* in strawberry leaves at different temperatures

Establishment of *C. rosea* in strawberry leaves at 10, 15, 20, 25, and 30°C was assessed using groups of 15 leaf discs (1cm-diameter) sprayed with a conidial suspension of the antagonist. Leaf discs were placed on PCA medium and plates were kept in incubators at each temperature studied. After 12 days, disc colonization by *C. rosea* was quantified with the scale described in 2.1.

The experiment was set in a completely randomized design in a factorial scheme of 5 *C. rosea* isolates x 5 temperature levels, and 4 repetitions (one plate with 15 discs = 1 repetition). The experiment was run twice.

2.6. Data analyses

For all experiments the area under the *C. rosea* sporulation curve was calculated (Campbell & Madden, 1990). Data of leaf surface with sporulation (LSS), area under the sporulation curve (AUSC), and mycelial growth were subjected to analysis of variance (ANOVA). When necessary, data were transformed by taking square root to satisfy ANOVA assumptions. Treatment means were compared by least significant difference test (Protected Fisher LSD, $\alpha=0.01$). Regression models were fit when necessary. Model fit was based on determination coefficient, mean square of errors, parameters significance, normality and unbiased distribution of the residuals. All statistical analysis were done using the SAS System v.8.

3. Results

3.1. Establishment of *Clonostachys rosea* as affected by leaf wetness duration

In the first experimental run, leaf disc surface with *C. rosea* sporulation (LSS) was significantly affected by isolates ($P=0.0001$) and duration of leaf wetness ($P=0.0001$), but not by the isolate x leaf wetness duration interaction. Despite the significant effect of leaf wetness duration, LSS had no defined trend (Figure 1). The LSS for isolates NCR19/F, NCR60/F, NCR61/F, NCR62/F, and Pg 88-710 varied between 7 and 13.5%, 8.5 and 12.5%, 5.2 and 10.7%, 6.6 and 11.3%, and 7.1 and 11.7%, respectively. Lowest LSS and AUSC values were registered for isolate NCR61/F (Table 1).

In the second run, LSS was significantly affected by isolates ($P=0.0043$), but not by duration of leaf wetness or isolate x leaf wetness duration interaction. LSS values for isolates NCR19/F, NCR60/F, NCR61/F, NCR62/F, and Pg 88-710 varied between 11.9 and 16.7%, 13.3 and 18.4%, 12.1 and 15.5%, 10.8 and 16.1%, and 11.4 and 13.5%, respectively. Lowest LSS values were recorded for isolates Pg 88-710 and NCR61/F and lowest AUSC values were for isolate Pg 88-710 (Table 1). There was not difference regarding AUSC for the Brazilian isolates (Table 1).

3.2. Establishment of *Clonostachys rosea* when leaf wetness periods started at different times after antagonist application

In the first experimental run, LSS was significantly affected by isolates ($P=0.0015$) as well as by time to start leaf wetness (TSLW) ($P=0.0004$), but not by isolate x TSLW interaction. Despite the significant effect of TSLW, LSS had no defined trend (Figure 2). LSS ranged between 10.4 and 13% for isolate NCR19F, 11.7 and 15.9% for NCR60/F, 10.5 and 13.5% for NCR61/F, 10.8 and 16% for NCR62/F, and 9.2 and 17.2% for Pg 88-710. Lowest LSS and AUSC values were estimated for isolate NCR19/F (Table 2).

In the second run, LSS was not significantly affected by either principal factors or their interaction. LSS ranged between 9.5 and 12.5% for isolate NCR19F, 10.9 and 13.6% for NCR60/F, 9.7 and 12.9% for NCR61/F, 9.1 and 16.1% for NCR62/F, and 8.4 and 13.9% for Pg 88-710. Isolates did not differ regarding AUSC values (Table 2).

3.3. Mycelial growth of *Clonostachys rosea* as affected by temperature

Mycelial growth of *C. rosea* was significantly affected by isolate and temperature. For NCR19/F, NCR60/F, and NCR61/F the cubic model best fit the data (Figure 3). The quadratic model best fit isolate NCR62/F data (Figure 3). The optimum temperature for mycelial growth was estimated as 25.6, 25.9, 25.0, and 29.0°C for isolates NCR19/F, NCR60/F, NCR61/F, and NCR62/F, respectively. At 25°C, mycelial growth varied among isolates ($P=0.0027$). AUCGC values for isolates NCR62/F, NCR19/F, NCR60/F, and NCR61/F were: 65.5, 81.4, 80.8, 79.4 cm.day, respectively. At 10, 15, 20, and 30°C there was no difference on mycelial growth among isolates.

3.4. Establishment of *Clonostachys rosea* in strawberry leaves at different temperatures

In the first experimental run, LSS was significantly affected by both isolates and temperature. Optimum temperature for sporulation of isolates NCR19/F, NCR60/F, NCR62/F, and Pg 88-710 was estimated as 24.0, 24.8, 24.9, 24.9°C, respectively, for which the quadratic model best fit the data (Figure 4). It was not possible to estimate maximum sporulation point for isolate NCR61/F, but its LSS value was highest at 30°C. For this isolate, the simple linear model best fit the data (Figure 4). At 10°C, LSS of all isolates was reduced (Figure 4). At 30°C, LSS for isolate NCR61/F was higher than LSS for isolates NCR19/F (12.6%), NCR60/F (17.0%), NCR62/F (13.3%), and Pg 88-710 (12.5%). LSS of isolates were similar at 15, 20, and 25°C. There was no difference regarding AUSC among isolates.

In the second run, only temperature significantly affected LSS ($P=0.0001$). The quadratic model best fit the LSS data (Figure 5). The optimum temperature for isolate sporulation was 25.9°C. There was no difference regarding AUSC among isolates.

4. Discussion

All *C. rosea* isolates colonized strawberry leaves. Even in prolonged periods of leaf wetness duration, which favor other epiphytic microorganisms (Morandi et al., 2000), *C. rosea* isolates were capable of colonizing leaves. Microorganisms (fungi, bacteria, and yeasts) were present in high number in leaf discs of the control treatment (data not quantified), but were absent in leaf discs treated with *C. rosea* isolates. Our results differ from those reported for isolate Pg 88-710 in rose leaves kept wet for 36 to 48h (Morandi, et al. 2001). Under prolonged period of rose leaf wetness, high amount of verticillate-type conidiophores of Pg 88-710 were observed and leaf area with sporulation was small (Morandi, et al. 2001). In our study, high penicilliate-type conidiophores were observed and no reduction in leaf disc area with sporulation was observed. Differences in leaf tissue properties may have contributed to the different response. As rose leaf tissue has higher fiber content than strawberry leaves, probably strawberry leaves were most prone to be colonized by *C. rosea*.

Leaf wetness did not affect the establishment of Brazilian isolates of *C. rosea* in strawberry, which may confers competitive advantage for the antagonist. It is important for the antagonist to establish both in prolonged and in short periods of leaf wetness. Prolonged periods of tissue wetness favor infection and sporulation of *B. cinerea* (Wilcox & Seem, 1994; Broome et al., 1995; Sosa-Alvarez et al., 1995; Sirysingh & Sutton, 1996; O'Neill et al., 1997; Xu et al., 2000), consequently an antagonist must be able to establish under similar conditions. The capacity of *C. rosea* to germinate and establish in strawberry leaves in short periods of wetness is important for the success of the fungus as biocontrol agent in commercial crop conditions. Under these conditions, mainly for field crops, antagonist will be exposed to variations in air relative humidity, host tissue water content, and lack of leaf wetness (Barrage, 1971; Köhl et al., 1995; Köhl & Fokkema, 1998). In the presence of inoculum of both antagonist and pathogen, *C. rosea* has less requirements of wetness duration and is likely to establish ahead of *B. cinerea*. Furthermore, all Brazilian isolates of *C. rosea* survived for 36h in relatively low moisture environment such as in growth chamber where relative humidity varied between 50 and 60%. This fact reinforces the low requirements of the antagonist. Similar results were obtained with *C. rosea* in rose leaves

(Morandi et al., 2001). However, isolate Pg 88-710 sporulated less in raspberry leaves when leaf wetness periods were shorter than 8h and temperatures were between 10 and 30°C (Yu & Sutton, 1998). In the experiment with raspberry leaves, only endophytic growth of *C. rosea* was assessed and leaf discs were disinfested before being transferred to PCA medium. Probably, because we did not disinfest the leaf discs the antagonist growth as epiphyte (Sutton et al., 1997) was important for strawberry tissue colonization after transferring to PCA medium.

Temperature was the most limiting variable to *C. rosea* development, similarly to what was reported for other antagonists and for *C. rosea* in other hosts (Sutton & Peng, 1993; Elad & Zimand, 1993; Shtienberg & Elad, 1997; Sutton et al. 1997; Yu & Sutton, 1998; Köhl et al., 1999; Guetsky et al., 2001). Temperature affected both mycelial growth *in vitro* and sporulation in leaf discs. The results reported were similar to those found with raspberry leaves in which isolate Pg 88-710 had low sporulation incidence at temperatures between 10 and 15°C even with 32 h of leaf wetness duration (Yu & Sutton, 1998). These results are important for setting strategies of biocontrol agent introduction. At low temperatures, more effective control measures such as chemical control or the combination of biological and chemical products should be used (Shtienberg & Elad, 1997). The application of biocontrol agents which are efficient at low temperatures, such as *Ulocladium atrum* (Köhl et al., 1999), is another possibility.

At 10°C sporulation of *C. rosea* isolates in leaf discs was scarce or nil, but isolates grew on PDA medium. Differential effects of temperature on sporulation and on mycelial growth could have been involved. In rose leaves treated with Pg 88-710 and kept at 10°C, the antagonist was capable of colonizing tissue and when tissue samples were collected and plated on PCA at 20°C *C. rosea* sporulated for up to one month (Morandi et al., 2001). Different enzymes are involved in mycelial growth and sporulation in leaf discs, thus different temperature requirements could account for differential effects (Köhl et al., 1999). However, isolate Pg 88-710 controlled strawberry gray mold even at 10°C (Sutton & Peng 1993).

The capacity of *C. rosea* isolates to establish in leaves with no water film at high temperatures (25 to 30°C) is important for antagonist survival between or even within growing seasons. These are not favorable conditions to *B. cinerea* in several hosts,

including strawberry (Wilcox & Seem, 1994; Broome et al., 1995; Sosa-Alvarez et al., 1995; Sirysingh & Sutton, 1996; O'Neill et al., 1997; Xu et al., 2000). Survival of *C. rosea* in crop debris varies. In rose leaves, isolate Pg 88-710 survived for a month in temperatures varying from 10 to 30°C (Morandi et al., 2001). However, in strawberry, rose, geranium, and petunia leaves only reduced colonization of four isolates of *C. rosea*, including Pg 88-710, after 8 days, under greenhouse conditions were reported (Nobre, 2003). New studies on the temporal dynamics need to be conducted in crop debris and whole plants to elucidate the antagonist capacity to establish endophytically. The pathogen survives in crop debris and sporulated for months (Braun & Sutton, 1988; Araújo, 1994). Thus, the longer the antagonist survives in crop debris the fewer the number of sprays necessary for disease control.

Brazilian isolates of *C. rosea* were as effective as or more effective than isolate Pg 88-710 in colonizing strawberry leaves. These isolates are expected to be efficient in competing with *B. cinerea* not only in strawberry but also in other hosts. New studies need to be conducted to elucidate the capacity of Brazilian isolates of *C. rosea* in reducing *B. cinerea* under controlled conditions and in commercial crops.

5 References

Araújo, A.E. Sobrevivência de *Botrytis cinerea* em restos de cultura, efeito de fatores de ambiente sobre o patógeno e progresso do mofo cinzento em roseiras cultivadas em casa de vegetação. Viçosa, MG: UFV, 1995. 98p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1995.

Braun, P.G., Sutton, J.C., 1988. Infection cycles and population dynamics of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. Canadian Journal of Plant Pathology 10, 133-141.

Broome, J.C., English, J.T., Marois, J.J., Latorre, B.A., Aviles, J.C., 1995. Development of an infection model for Botrytis bunch rot of grapes based on wetness duration and temperature. Phytopathology 85, 97-102.

Burrage, S.W. The micro-climate at the leaf surface. In: T.F. Preece; C.H. Dickinson (Eds.), Ecology of leaf surface microorganisms. London: Academic Press, 1971. p. 91-101.

- Campbell, C.L., Madden, L.V. Introduction to plant disease epidemiology. New York: John Wiley & Sons, 1990. 532 p.
- Dik, A.J., Elad, Y. 1999. Comparison of antagonists of *Botrytis cinerea* in greenhouse-grown cucumber and tomato under different climatic conditions. European Journal of Plant Pathology 105, 123-37.
- Elad, Y., 1996. Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. European Journal of Plant Pathology 102, 719-32.
- Elad, Y., Köhl, J., Fokkema, N.J. 1994. Control of infection and sporulation of *B. cinerea* on bean and tomato by saprophytic yeasts. Phytopathology 84, 1193-200.
- Elad, Y., Zimand, G., 1993. Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber gray mould (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. Plant Pathology 42, 324-32.
- Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., Dinooor, A., 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. Phytopathology 91, 621-627.
- Gullino, M.L. Chemical control of *Botrytis spp.* In: 10th International Botrytis Symposium, 1992, Heraklion, Crete, Greece. Proceedings.10th International Botrytis Symposium: 1992. p. 217-22.
- Hannusch, D.J.; Boland, G.J., 1996. Influence of air temperature, relative humidity on biological control of white mold of bean (*Sclerotinia sclerotiorum*). Phytopathology 86, 156-62.
- Jarvis, W.R. Epidemiology. In: J.R. Coley-Smith; K. Verhoeff; W.R. Jarvis (Eds.), The Biology of Botrytis. London: Academic Press, 1980. p. 219-50.
- Jarvis, W.R. Managing diseases in greenhouse crops. Harrow: APS Press, 1992. 288 p.
- Johnson, K.B., Sawyer, T.L., Powelson, M.L., 1994. Frequency of benzimidazole and dicarboximide resistant strains of *Botrytis cinerea* in western Oregon small fruit and snap bean plantings. Plant Disease 78, 572-77.

- Köhl, J., Lomabers-van der Plas, C.H., Molhoek, W.M.L., Kessel, G.J.T., 1999. Competitive ability of the antagonists *Ulocladium atrum* and *Gliocladium roseum* at temperatures favourable for *Botrytis* spp. development. *Biocontrol* 44, 329-46.
- Köhl, J., Fokkema, N.J., 1998. Strategies for biological control of necrotrophic fungal foliar pathogens. In: Boland, G.J., Kuykendall, L.D. (Eds), *Plant-Microbe Interactions and Biological Control*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 49-88.
- Köhl, J., Van der Plas, C.H., Molhoek, W.M.L., Fokkema, N.J., 1995. 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* 101, 627-637.
- LaMondia, J.A., Douglas, S.M., 1997. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from Connecticut greenhouses to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Plant Disease* 81, 729-32.
- Monteiro, A.J.A. Avaliação da remoção de restos culturais e de fungicidas na intensidade do mofo cinzento em roseiras cultivadas em casas de vegetação. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa, 1996. 49 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)- Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- Morandi, M.A.B., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G., Alfenas, A.C., Barbosa, J.G., 2003. Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: a valuable component in *Botrytis* blight management in commercial greenhouses. *Biological Control* 26, 311-317.
- Morandi, M.A.B., Maffia, L.A., Sutton, J.C., 2001. Development of *Clonostachys rosea* and interactions with *Botrytis cinerea* in rose leaves and residues. *Phytoparasitica* 29, 103-113.
- Morandi, M.A.B., Sutton, J.C., Maffia, L.A., 2000. Effects of host and microbial factors on development of *Clonostachys rosea* and control of *Botrytis cinerea* in rose. *European Journal of Plant Pathology* 106, 439-448.
- Nobre, S.A.M. Obtenção de isolados de *Clonostachys rosea* com potencial para biocontrole de *Botrytis cinerea*. Viçosa, MG: Universidade Federal Viçosa, 2003. 75 p. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal Viçosa, 2003.

- O'Neill, T.M., Shtienberg, D., Elad, Y., 1997. Effect of some host and microclimate factors on infection of tomato stems by *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 81, 36-40
- Pak, H.A., Beever, R.E., Laracy, E.P., 1990. Populations dynamics of dicarboximide-resistant strains of *Botrytis cinerea* on grapevine in New Zealand. *Plant Pathology* 39, 501-09
- Peng, G., Sutton, J.C., 1991. Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. *Canadian Journal of Plant Pathology* 13, 247-257.
- Schroers, H.J., Samuels, G.J., Seifert, K.A., Gams, W., 1999. Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. *Mycology* 91, 365-385.
- Shtienberg, D., Elad, Y., 1997. Incorporation of weather forecasting in integrated, biological-chemical management of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 87, 332-340.
- Sirjusingh, C., Sutton, J.C., 1996. Effects of wetness duration and temperature on infection of geranium by *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 80, 160-165.
- Sosa-Alvarez, M., Madden, L.V., Ellis, M.A., 1995. Effects of temperature and wetness duration on sporulation of *Botrytis cinerea* on strawberry leaf residues. *Plant Disease* 79, 609-615.
- Sutton, J.C., Li, D.W., Peng, G., Yu, H., Zhang, P., Valdebenito-Sanhueza, R.M., 1997. *Gliocladium roseum*: A versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Disease* 81, 316-328.
- Sutton, J.C., Liu, W., Huang, R., Owen, G.N., 2002. Ability of *Clonostachys rosea* to establish and suppress sporulation potential of *Botrytis cinerea* in deleafed stems of hydroponic greenhouse tomatoes. *Biocontrol Science and Technology* 12, 413-425.
- Sutton, J.C., Peng, G., 1993. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. *Phytopathology* 83, 615-621.
- Tatagiba, J.S. Maffia, L.A., Barreto, R.W., Alfenas, A.C., Sutton, J.C., 1998. Biological control of *Botrytis cinerea* in residues and flowers of rose (*Rosa hybrida*). *Phytoparasitica* 26, 8-19.

- Valdebenito-Sanhueza, R.M., Sutton, J.C., Perazzolo, I., Czermainski, A.B.C., 1997. Controle biológico de *Botrytis cinerea* em morangueiros cultivados em estufa. *Fitopatologia Brasileira* 22, 69-73.
- Xu, X.M., Harris, D.C., Berrie, A.M., 2000. Modeling infection of strawberry flowers by *Botrytis cinerea* using field data. *Phytopathology* 90, 1367-74.
- Yu, H., Sutton, J.C., 1997. Morphological development and interactions of *Gliocladium roseum* and *Botrytis cinerea* in raspberry. *Canadian Journal of Plant Pathology* 19, 237-246.
- Yu, H., Sutton, J.C., 1998. Effects of inoculum density, wetness duration, and temperature on control of *Botrytis cinerea* by *Gliocladium roseum* in raspberry. *Canadian Journal of Plant Pathology* 20, 243-252.
- Yourman, L.F., Jeffers, S.N., 1999. Resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in greenhouse isolates of *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 83, 569-75.
- Yourman, L.F., Jeffers, S.N., Dean, R.A., 2000. Genetic analysis of isolates of *Botrytis cinerea* sensitive and resistant to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Phytopathology* 90, 851-59.
- Wilcox, W.F., Seem, R.C., 1994. Relationship between strawberry gray mold incidence, environmental variables, and fungicide applications during different periods of the fruiting season. *Phytopathology* 84, 264-70.

Table 1- Establishment of *Clonostachys rosea* isolates in strawberry leaves kept under different durations of leaf wetness, in two experimental runs. In both runs, the effect of the interaction isolate x duration of leaf wetness was not significant.

Isolate	Run 1		Run 2	
	LSS ¹	AUSC ²	LSS	AUSC
NCR60/F	10.61a ³	508.53a	16.16 a	771.17a
NCR19/F	10.37a	486.8 a	14.21 ab	676.07ab
Pg 88-710	9.61 ab	472.83ab	12.58 b	606.1 b
NCR62/F	9.33 ab	431.6 ab	14.17 ab	672.63 ab
NCR61/F	7.84 b	377.5 b	13.78 b	664.53 ab

¹ Leaf surface with sporulation (%), assessed after 10 days of incubation in PCA medium.

² Area under the sporulation curve of *Clonostachys rosea* as a function of duration of moist chamber (%.h)

³ Means followed by the same letter, in each column, do not differ according to Fisher LSD test ($\alpha=0.01$).

Table 2- Establishment of *Clonostachys rosea* isolates in strawberry leaves in which leaf wetness started at different times after antagonist application, in two experimental runs. In both runs, the effect of the interaction isolate x starting time of leaf wetness was not significant.

Isolate	Run 1		Run 2	
	LSS ¹	AUSC ²	LSS ⁴	AUSC ⁴
NCR60/F	14.22a ³	523.77a	11.49a	421.57a
Pg 88-710	12.83 ab	483.17ab	10.79a	411.37a
NCR62/F	12.71 ab	458.93 ab	12.85a	493.47a
NCR61/F	12.49 ab	457.7 ab	11.24a	414.2 a
NCR19/F	11.57 b	422.87 b	11.22a	420.17a

¹ Leaf surface with sporulation (%), assessed after 10 days of incubation in PCA medium.

² Area under the sporulation curve of *Clonostachys rosea* as a function of starting time of moist chamber (%.h)

³ Means followed by the same letter, in each column, do not differ according to Fisher LSD test ($\alpha=0.01$).

⁴ Means followed by the same letter, in each column, do not differ according to F test, in the analysis of variance.

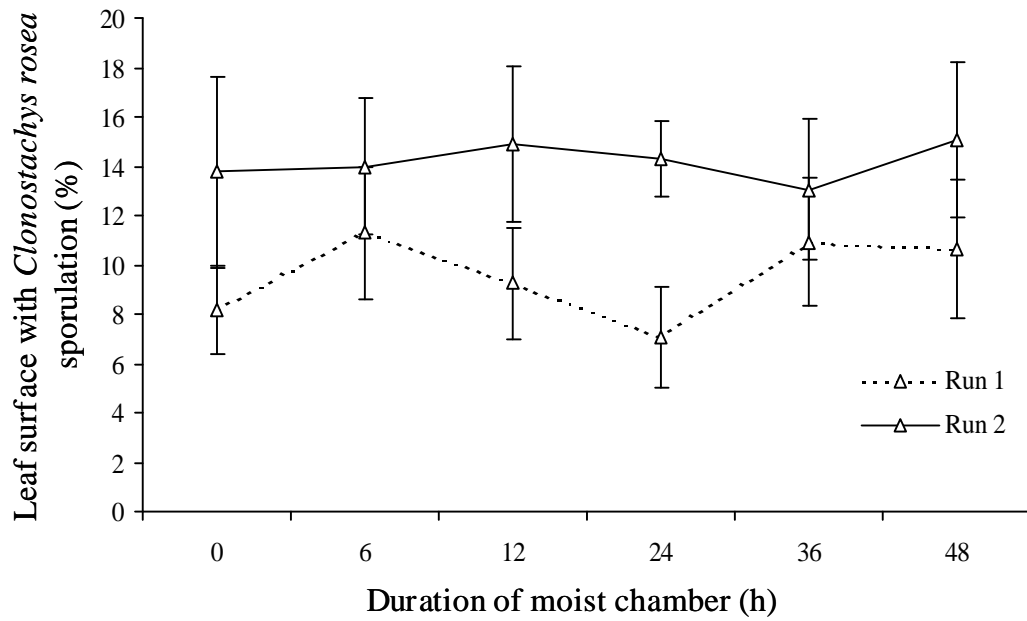


Figure 1- Surface with *Clonostachys rosea* sporulation in strawberry leaves that were kept at different durations of wetness, in two experimental runs. Error bars represent standard deviation of the means

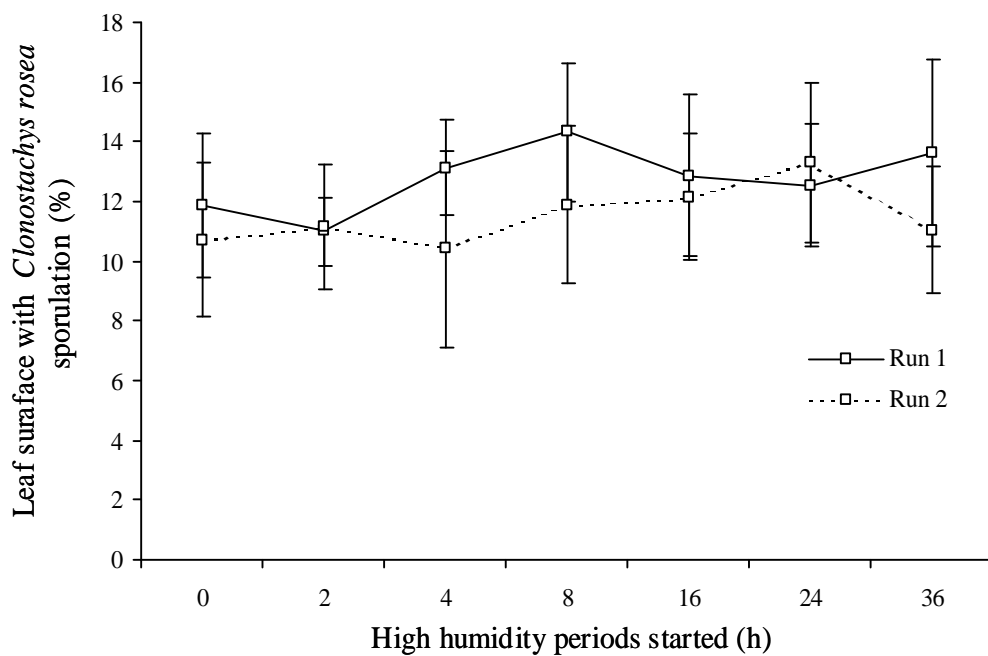


Figure 2- Surface with *Clonostachys rosea* sporulation in strawberry leaves in which wetness started at different times after antagonist application. Error bars represent standard deviation of the means

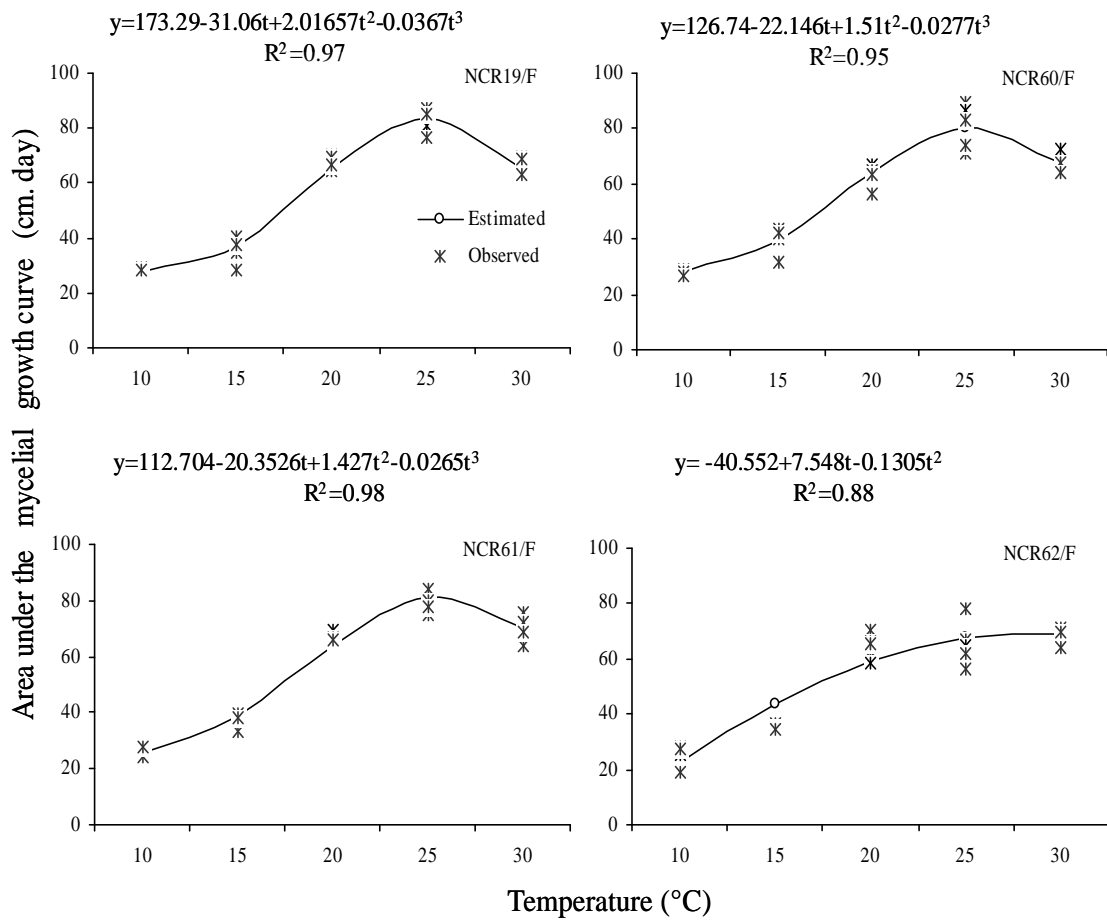


Figure 3. Mycelial growth (y) of four isolates of *C. rosea* at different temperatures (t). Colony radial growth was measured at every four days, during 19 days, and the area under mycelial growth curve was calculated for each repetition.

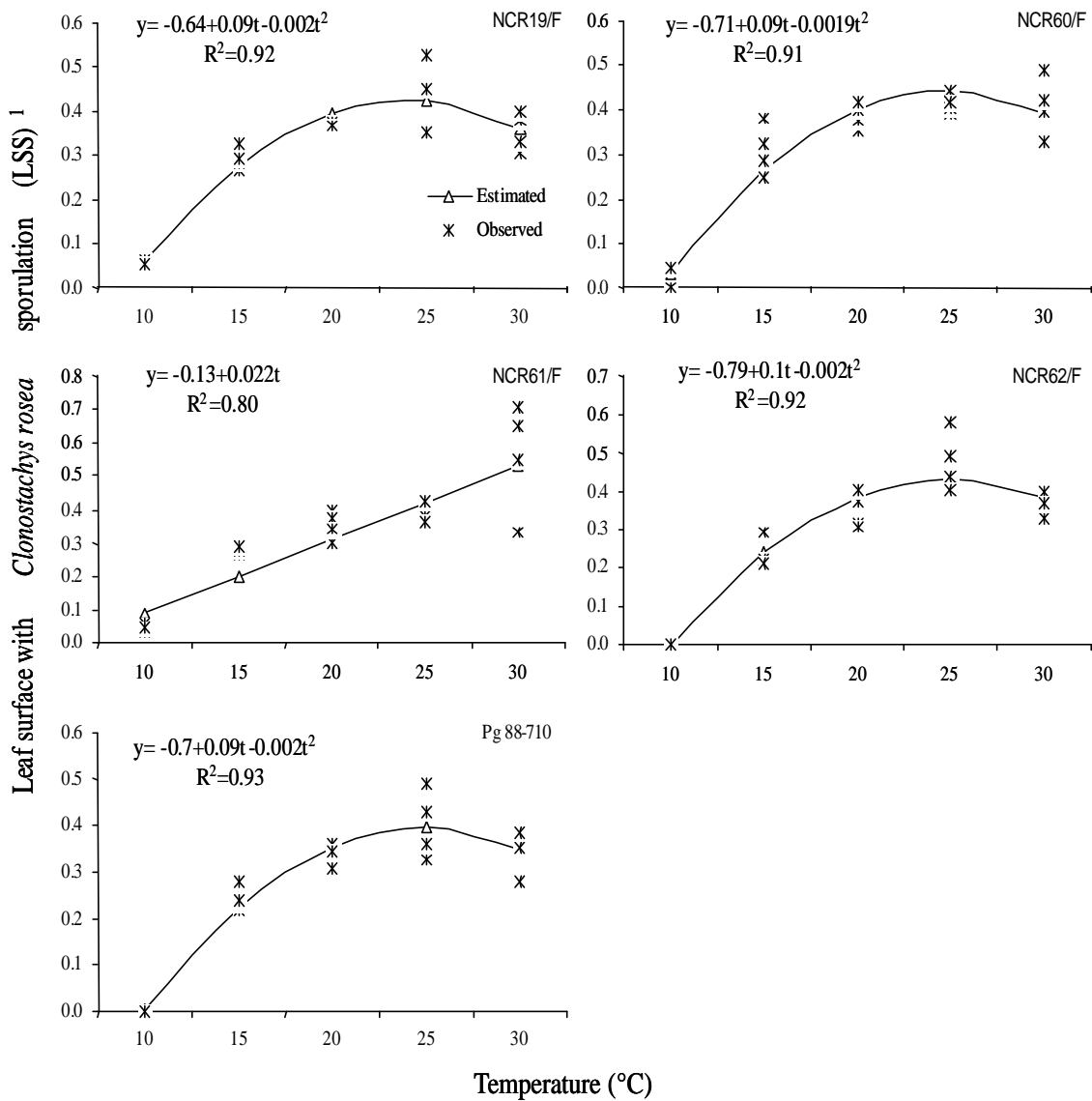


Figure 4- Strawberry surface with *C. rosea* sporulation (y) in leaf discs plated on PCA medium and incubated at different temperatures (t) for 12 days. First experimental run. ¹Leaf surface with sporulation = (LSS/100)^{1/2}

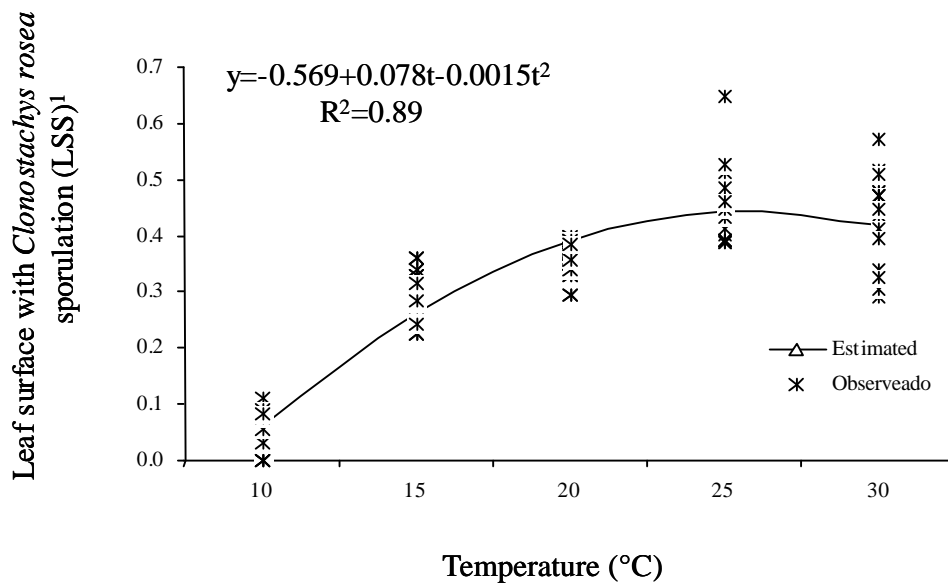


Figure 5. Strawberry surface with *Clonostachys rosea* sporulation (y) in leaf discs plated on PCA medium and incubated at different temperatures (t) for 12 days. Second experimental run. ¹Leaf surface with sporulation = $(LSS/100)^{1/2}$.

CAPÍTULO 2

Supressão da esporulação de *Botrytis cinerea* por isolados de *Clonostachys rosea* em folhas de morangueiro, em diferentes temperaturas e níveis de umidade

Resumo

Em folhas de morangueiro inoculadas com *Botrytis cinerea* (Bc), estudou-se a influência da temperatura e da umidade no antagonismo de cinco isolados de *Clonostachys rosea* (Cr) (quatro obtidos em ecossistemas brasileiros e o Pg 88-710, obtido no Canadá) ao patógeno. Todos os isolados colonizaram as folhas e reduziram a esporulação do patógeno em níveis superiores a 93%, nas folhas submetidas a intervalos de 0 a 36h de ausência de molhamento foliar após serem aplicados. Similarmente, todos os isolados colonizaram as folhas e reduziram a esporulação de Bc em níveis superiores a 90%, nas folhas submetidas a intervalos de 0 a 48h de duração de câmara úmida, após serem aplicados. A temperatura limitou o desenvolvimento de Cr e o seu antagonismo a Bc. A 10°C, os isolados de Cr não esporularam e nenhum isolado reduziu a esporulação do patógeno; a 15°C, os isolados reduziram de 37,1 a 72,3% a esporulação; a 20°C, a redução foi acima de 85,7% e, a 25 e 30°C, Bc não esporulou. Nas condições testadas, os isolados de Cr obtidos em condições brasileiras foram tão ou mais eficientes que o proveniente do Canadá em colonizar folhas de morangueiro e nelas suprimir a esporulação de Bc.

ABSTRACT

***Botrytis cinerea* suppression sporulation by *Clonostachys rosea* isolates in strawberry leaves under different temperatures and humidity levels**

The effect of temperature and moisture on the antagonism of the *Clonostachys rosea* (Cr) to *Botrytis cinerea* (Bc) on strawberry leaves was quantified. Four isolates of Cr from Brazilian ecosystems plus the isolate PG 88-710, from Canada, were used in all experiments. All five isolates reduced more than 93% of pathogen sporulation on leaves that were kept without wetness up to 36h after isolates application. All isolates also reduced more than 90% of pathogen sporulation on leaves that were exposed to intervals varying from 0 to 48h of moist chamber, after the isolates application. Temperature affected both Cr development and antagonism to Bc. At 10°C, Cr isolates did not reduce pathogen sporulation; at 15°C, reduction of pathogen sporulation varied from 37.1 to 72.3%; at 20°C, the reduction was larger than 85.7%; at 25 and 30°C Bc did not sporulate. The four Brazilian isolates were similar to a Canadian isolate regarding leaf colonization efficiency and antagonistic capacity to Bc, under the tested experimental conditions.

1. INTRODUÇÃO

Botrytis cinerea Pers.: Fr., cujo telomorfo é o ascomyceto *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel, é patógeno necrotrófico, de ampla distribuição geográfica, que infecta várias culturas de importância econômica, principalmente em condições de casa de vegetação (Jarvis, 1980, 1992). As doenças causadas por *B. cinerea*, comumente denominadas de mofo cinzento, são de difícil controle, pois o patógeno pode infectar as plantas em quase todos os estádios de desenvolvimento, durante o armazenamento ou transporte, e afetar todos os órgãos aéreos da planta (Gullino, 1992). Entre as medidas de controle do mofo cinzento incluem-se práticas culturais, como controle do ambiente e eliminação de restos culturais (Jarvis, 1992; Monteiro, 1996). O controle químico, amplamente utilizado, é dificultado, em vista da ocorrência de populações do patógeno resistentes a fungicidas (Barak & Edgington, 1984; Gullino, 1992; Johnson et al., 1994; Ghini, 1996; LaMondia & Douglas, 1997; Yourman & Jeffers, 1999). Assim, é importante desenvolverem-se medidas alternativas de manejo da doença, como o controle biológico.

O controle biológico é medida interessante no manejo das doenças causadas por *B. cinerea*, pois suplementa pontos falhos associados ao controle químico. As principais estratégias de biocontrole de *B. cinerea* envolvem a supressão da infecção e, ou, da esporulação (Fokkema, 1993; Sutton & Peng, 1993; Köhl et al., 1995; Köhl et al., 1998; Morandi et al., 2001, 2003). O uso de microrganismos do filoplano tem sido avaliado para o controle de mofo cinzento em diferentes hospedeiros (Blackeman & Fokkema, 1982; Elad, 1996). No entanto, apenas a supressão da infecção por *B. cinerea* por antagonistas que competem por nutrientes no filoplano não é eficiente (Fokkema, 1993; Elad, 1996). O tempo de interação do antagonista e o patógeno é curto; esporos do patógeno germinam, os tubos germinativos penetram rapidamente nos tecidos e escapam do antagonista (Fokkema, 1993). Por exemplo, em bagas de uva, as primeiras infecções ocorrem com 4 h de molhamento, entre 12 a 30°C (Broome et al., 1995). Assim, a atuação do antagonista deve ser rápida o suficiente para que *B. cinerea* não infecte o hospedeiro. Antagonistas que competem com o crescimento saprófito de *Botrytis spp.* podem reduzir o crescimento e a esporulação dos patógenos em restos culturais (Köhl et al., 1995; Morandi et al., 2003), o que resultará na redução da taxa de progresso da doença. Uma vantagem do uso destes

antagonistas é que o tempo de interação do patógeno e o antagonista nos restos culturais é longo (Fokkema, 1993).

Clonostachys rosea (Link: Fr.) Schroers, Samuels, Siefert & W. Gams (Schroers *et al.*, 1999) é fungo antagonista a *B. cinerea*, que reduz o desenvolvimento e a esporulação do patógeno, por meio de hiperparasitismo e competição por nutrientes na colonização de tecidos senescentes e mortos (Sutton *et al.*, 1997; Yu & Sutton, 1997; Kohl & Fokkema, 1998; Morandi *et al.* 2001). O antagonista foi eficiente no controle de *B. cinerea* em vários hospedeiros (Peng & Sutton, 1991; Sutton *et al.*, 1997; Yu & Sutton, 1997; 1998; Shafia *et al.*, 2001; Sutton *et al.*, 2002). Ademais, a capacidade de *C. rosea* de se estabelecer endofiticamente em tecidos vegetais é vantagem competitiva importante (Sutton *et al.*, 1997; Yu & Sutton, 1997; Köhl & Fokkema, 1998; Morandi *et al.*, 2001).

No Brasil, em trabalhos com o controle biológico de *B. cinerea*, comprovou-se a eficiência do isolado Pg 88-710 de *C. rosea* (Peng & Sutton, 1991) em suprimir a esporulação do patógeno em eucalipto (Von Stowasser & Ferreira, 1997), morango (Valdebenito-Sanhueza *et al.*, 1997) e roseira (Tatagiba *et al.*, 1998; Morandi *et al.*, 2000, 2001, 2003). O antagonista sobreviveu por um mês em restos culturais de roseira, mantidos entre 10 e 30°C, foi pouco afetado pela ausência de período prolongado de molhamento foliar após a sua aplicação (Morandi *et al.*, 2001) e se estabeleceu em tecidos de roseira, onde suprimiu a esporulação do patógeno, independente do estágio de desenvolvimento (Morandi *et al.*, 2000). Em experimentos conduzidos em casa de vegetação, *C. rosea* foi eficiente em suprimir a esporulação de *B. cinerea* nos restos culturais de roseira, mesmo em condições favoráveis ao patógeno (Morandi *et al.*, 2003).

Em vista do sucesso obtido com o controle biológico de *B. cinerea* por *C. rosea*, a possibilidade de se encontrar isolados do antagonista adaptados a ecossistemas brasileiros, além da limitada permissão de uso do isolado canadense do antagonista Pg 88-710, iniciou-se busca por isolados nativos do Brasil com potencial para uso em controle biológico do patógeno. Selecionaram-se quatro isolados de *C. rosea* potencialmente eficientes, que se estabeleceram em folhas de roseira, morangueiro, eucalipto e tomateiro e nelas suprimiram a esporulação de *B. cinerea* (Nobre, 2003). Como na maioria das seleções iniciais de agentes de biocontrole, os trabalhos foram realizados em condições ótimas para estabelecimento do antagonista, dificilmente encontradas no campo (Burrage, 1971; Kohl

& Fokkema, 1998). Ainda não se conhecem os requerimentos ecológicos dos isolados brasileiros de *C. rosea*. O entendimento de como a temperatura e a umidade afetam a atividade do antagonista é importante para otimização do seu uso e implementação de estratégias de controle biológico. Assim, no presente trabalho estudou-se a influência da temperatura e umidade no antagonismo de isolados de *C. rosea* a *B. cinerea*.

2. Material e Métodos

Os trabalhos foram executados no Laboratório de Epidemiologia e em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da UFV. Para todos os ensaios, adotaram-se procedimentos comuns, descritos a seguir.

Utilizaram-se plantas de morango (*Fragaria ananassa* L.) ‘Dover’, produzidas em casa de vegetação (temperatura de, no máximo, 25°C), cultivadas em vasos plásticos de 20cm de diâmetro (4 L), contendo mistura solo: esterco bovino curtido: areia (proporção 11:4:1) tratada com brometo de metila. As plantas foram adubadas a cada 60 dias com 5g de NPK (4:14:8)/vaso. Flores e folhas velhas eram removidas periodicamente para reduzir a chance de infecção por *B. cinerea*. Em todos os experimentos, utilizaram-se folhas verdes, completamente expandidas, com cerca de 20 a 30 dias de idade.

Em todos os experimentos, utilizaram-se quatro isolados de *C. rosea* obtidos em condições brasileiras: NCR19/F, NCR60/F, NCR61/F e NCR62/F, selecionados pela capacidade de estabelecimento e de supressão da esporulação de *B. cinerea* em folhas de morangueiro, tomateiro, roseira e eucalipto (Nobre, 2003). Para fins comparativos, incluiu-se o isolado Pg 88-710 (Peng & Sutton, 1991). Conídios de cada isolado foram produzidos em meio de batata-dextrose-ágar (BDA) a 25°C sob luz branca fluorescente, 12h de fotoperíodo. Utilizou-se o isolado MoB1 de *B. cinerea*, selecionado pela sua agressividade em folhas de morangueiro (Nobre, 2003). Os conídios do patógeno foram produzidos em meio BDA, a 20°C, sob luz branca fluorescente, 12h de fotoperíodo.

Após 10 a 14 dias de cultivo, os conídios de cada isolado do antagonista e do patógeno foram suspensos em água destilada esterilizada adicionada de Tween 20 (0,05% v/v), e se efetuou filtragem em duas camadas de gaze. A concentração de conídios foi estimada com auxílio de um hemacitômetro e ajustada para 10^6 e 10^5 conídios.mL⁻¹, para

cada isolado do antagonista e patógeno, respectivamente. As suspensões de conídios foram atomizadas nas folhas com atomizador De Vilbiss No. 15. Nos folíolos da testemunha, aplicou-se água destilada esterilizada adicionada de Tween 20 (0,05% v/v).

Avaliou-se indiretamente colonização dos tecidos por *B. cinerea* e isolados de *C. rosea*, quantificando-se a intensidade de esporulação de cada fungo nos tecidos foliares de morangueiro. Para tanto, discos de folha foram transferidos para placas de Petri (90mm) contendo meio paraquat-cloranfenicol-agar (PCA) (Peng & Sutton, 1991), incubando-se a 20°C, por 10-12 dias. Estimou-se a percentagem da área dos discos com esporulação de *C. rosea* e *B. cinerea*, sob microscópio estereoscópico. Para *C. rosea*, utilizou-se a escala de notas: 0= 0; 1= 0-3; 2= >3-6; 3= >6-12; 4= >12-25; 5= >25-37; 6 = >37-50; 7 = >50% da área dos discos colonizados (Nobre, 2003). Para *B. cinerea*, utilizou-se a escala de notas: 0=0; 1=1-12; 2=13-24; 3=25-48; 4=49-100; 5=101-200; 6=201-300; 7=301-400 conidióforos por disco de folha (Peng & Sutton, 1991). Para análise estatística, os valores de cada classe foram convertidos para o ponto médio do intervalo. Os dados de cada repetição, foram representados pela média dos 15 discos foliares. Cada um dos experimentos descritos a seguir foi executado por duas vezes.

2.1. Supressão da esporulação de *Botrytis cinerea* por *Clonostachys rosea*, em diferentes intervalos de início da câmara úmida após aplicação do antagonista

Folíolos acondicionados em caixas tipo gerbox, forradas com espuma embebida em água e cobertas com tela plástica (malha = 2mm), foram inoculados com *B. cinerea* e mantidos a 20 °C, 12 h de fotoperíodo. Após 24 h de câmara úmida, os folíolos foram transferidos para outra caixa, contendo espuma seca coberta com tela plástica (malha = 2mm) e foram tratados com *C. rosea*. Após aplicação do antagonista, as caixas permaneceram abertas durante 0, 2, 4, 8, 16, 24 ou 36 h. Transcorrido cada intervalo, as espumas foram umedecidas e as caixas fechadas, reestabelecendo-se a câmara úmida. Após 24 h, os folíolos foram secos ao ar por 30 min. e, de cada repetição, confeccionaram-se 15 discos (1 cm de diâmetro), os quais foram transferidos para meio PCA e se quantificou a colonização dos discos por *B. cinerea* e *C. rosea*.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial, com sete intervalos de início da câmara úmida, cinco isolados do antagonista, além da testemunha, e três repetições (uma caixa gerbox com dois folíolos = uma repetição).

2.2. Supressão da esporulação de *Botrytis cinerea* por *Clonostachys rosea*, em diferentes intervalos de umidade após a aplicação do antagonista

Folíolos acondicionados em caixas tipo gerbox, forradas com espuma embebida em água e coberta com tela plástica (malha = 2mm), foram inoculados com *B. cinerea* e mantidos a 20 °C, 12 h de fotoperíodo. Após 24 h de câmara úmida, os folíolos foram tratados com *C. rosea* e mantidos em câmara úmida durante 0, 6, 12, 24, 36 ou 48 h. Após transcorrido cada intervalo, os folíolos foram secos ao ar por 30 min e, de cada repetição, confeccionaram-se 15 discos (1 cm de diâmetro), os quais foram transferidos para meio PCA e se quantificou a colonização por *B. cinerea* e *C. rosea*.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial, com seis intervalos de umidade, cinco isolados do antagonista, além da testemunha, e três repetições (um gerbox com dois folíolos = uma repetição).

2.3. Supressão da esporulação de *Botrytis cinerea* por *Clonostachys rosea* em diferentes temperaturas

Folíolos acondicionados em caixas tipo gerbox, forradas com espuma embebida em água e coberta com tela plástica, foram inoculados com *B. cinerea* e mantidos a 20 °C, 12h de fotoperíodo. Após 24 h de câmara úmida, de cada repetição, confeccionaram-se 15 discos (1 cm de diâmetro) dos folíolos. Atomizou-se suspensão de conídios de *C. rosea* nos discos, os quais foram plaqueados em meio PCA e mantidos a 10, 15, 20, 25 ou 30°C. Após 12 dias, quantificou-se a colonização dos discos por *B. cinerea* e *C. rosea*.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial, com cinco isolados do antagonista, além da testemunha, cinco níveis de temperatura e quatro repetições (uma repetição = uma placa de petri com 15 discos foliares).

2.4. Análise dos dados

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., Cary, NC). Para todos os experimentos, calculou-se a percentagem de supressão de *B. cinerea* (REP) por isolados de *C. rosea* em relação ao tratamento testemunha, utilizando-se a equação: $REP = [(C-c)/C] * 100$; na qual C= número médio de conidióforos de *B. cinerea* na testemunha e c= número médio de conidióforos de *B. cinerea* nos discos foliares tratados com isolados de *C. rosea*. Para todos os experimentos, calculou-se a área abaixo da curva de esporulação do antagonista (AACEA), utilizando-se a fórmula de integração trapezoidal (Campbell & Madden, 1990). Os dados da superfície foliar com esporulação de *C. rosea* (SFCA), AACEA, número médio de conidióforos de *B. cinerea* (NMC) e REP foram submetidos à análise de variância. Para atender às pressuposições dessa análise, os valores de NMC foram transformados para raiz quadrada. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de diferença mínima significativa (Fisher LSD, $\alpha=0,05$).

3. Resultados

3.1 Supressão da esporulação de *Botrytis cinerea* por *Clonostachys rosea*, em diferentes intervalos de início da câmara úmida após aplicação do antagonista

Na primeira execução do experimento, detectou-se efeito significativo de isolados de *C. rosea* ($P < 0,0001$) e de intervalos de início da câmara úmida ($P = 0,013$), mas não da interação isolados - intervalos de início da câmara úmida, no NMC. O NMC nos discos foliares tratados com o isolado NCR19/F variou de 0 a 8,6; com o NCR60/F de 0 a 3,17; com o NCR61/F de 0,14 a 2,63; com o NCR62/F de 0 e 5,66; com o Pg 88-710 de 0,14 a 8,4, enquanto na testemunha variou de 68 a 164,38. Os valores de NMC de todos os isolados diferiram do da testemunha e não diferiram entre si.

Todos os isolados de *C. rosea* reduziram a esporulação de *B. cinerea*. Não houve efeito significativo de isolados, nem de intervalos de início da câmara úmida na REP. A interação isolados-intervalos de início da câmara úmida foi significativa ($P = 0,031$), mas

não se detectou efeito significativo de isolado em nenhum intervalo de início da câmara úmida. Os valores de REP foram maiores que 93%, para todos os isolados (Figura 1).

Quanto à SFCA, detectou-se efeito significativo apenas de isolados ($P < 0,0001$). Maiores valores de SFCA ocorreram com os isolados NCR60/F (16,9%) e NCR62/F (15,4%), enquanto o menor valor foi com o Pg 88-710 (10,3%). O valor de SFCA com os isolados NCR19/F (13,7%) e NCR61/F (14,7%) não diferiu da SFCA com NCR62/F.

Quanto à AACEA, detectou-se efeito significativo de isolados de *C. rosea* ($P = 0,001$). O valor de AACEA com o isolado Pg 88-710 foi o menor (365,2 % .h) e, com o isolado NCR60/F, o maior (600,03%.h). O valor de AACEA com esse último não diferiu do com os isolados NCR62/F (565,77%.h) e NCR61/F (517,77%.h). A AACEA com o isolado NCR19/F (508,675%.h) não diferiu da com os isolados NCR62/F e NCR61/F.

Na segunda execução, detectou-se efeito significativo de isolados de *C. rosea* ($P < 0,0001$) e de intervalos de início da câmara úmida ($P < 0,0001$), mas não da interação isolados-intervalos de início da câmara úmida, no NMC. O NMC nos discos foliares tratados com *C. rosea* foi menor que o da testemunha, mas não diferiu entre os isolados. O NMC nos discos tratados com o isolado NCR19/F variou de 0,72 a 17,72; com o NCR60/F de 0,58 a 32,08; com o NCR61/F de 0,72 e 18,51; com o NCR62/F de 0,7 a 18,18; com o Pg 88-710 de 1,54 a 17,58 e na testemunha de 189,03 a 280,13.

Todos os isolados de *C. rosea* suprimiram a esporulação de *B. cinerea* de forma similar. Não houve efeito significativo de isolados de *C. rosea* e a interação isolado-intervalo de início da câmara úmida não foi significativa. Detectou-se efeito significativo de intervalo de início da câmara úmida ($P < 0,0001$). A REP foi menor com 36h de intervalo de início da câmara úmida (92,5%) (Figura 1) e foi superior a 96% para todos os isolados de *C. rosea*.

Quanto à SFCA, detectou-se efeito significativo apenas de intervalo de início da câmara úmida ($P = 0,003$), contudo a variação foi pequena (Figura 2). A AACEA não variou significativamente com os isolados de *C. rosea* ($P = 0,854$).

3.2 Supressão da esporulação de *Botrytis cinerea* por *Clonostachys rosea*, em diferentes intervalos de umidade após a aplicação do antagonista

Na primeira execução do experimento, detectou-se efeito significativo da interação isolado-intervalo de duração da câmara úmida ($P=0,005$) no NMC. Todos os isolados de *C. rosea* reduziram o NMC em relação à testemunha, em todos os intervalos de umidade (Tabela 1). Com 0 h de câmara úmida, o NMC foi menor com o isolado NCR19/F; com 6h, o NMC foi menor com o isolado Pg 88-710, porém não diferiu do NMC com NCR61/F; com 12 h, o NMC foi menor com os isolados NCR19/F e NCR61/F, mas não diferiu do com os isolados NCR60/F e Pg 88-710; com 24h, o NMC foi menor com os isolados NCR60/F e Pg 88-710, porém não diferiu do com os isolados NCR19/F e NCR61/F; com 36 e 48h não houve diferenças entre os isolados de *C. rosea* (Tabela 1).

Quanto à SFCA, detectou-se efeito significativo de isolado de *C. rosea* ($P=0,002$) e intervalo de duração da câmara úmida ($P=0,002$), mas não da interação isolado-intervalo de duração da câmara úmida. A SFCA foi menor com o isolado NCR62/F (11,8%) e maior com o isolado NCR61/F (15,6%), porém não diferiu da com os isolados NCR19/F (14,8%), NCR60/F (14,2%) e Pg 88-710 (13,9%). A SFCA foi maior com 0 e 48h de intervalo de duração de câmara úmida (Figura 3).

Quanto à AACEA, detectou-se efeito significativo de isolados de *C. rosea* ($P=0,006$). O isolado NCR61/F resultou em maior AACEA (753,73 % .h), que não diferiu da com os isolados NCR19/F (683 % .h) e NCR60/F (660,63 % .h). O isolado NCR62/F resultou em menor AACEA (513,07 % .h). A AACEA com o isolado Pg 88-710 (634,43 % .h) não diferiu da com os isolados NCR60/F e NCR19/F.

Quanto à REP, obteve-se efeito significativo de isolados ($P=0,002$), intervalo de duração da câmara úmida ($P<0,0001$), mas não da interação isolado-duração de câmara úmida. A REP com o isolado NCR62/F (86,3%) foi a menor. A REP não diferiu entre os isolados NCR19/F (92,5%), Pg 88-710 (90,6%), NCR60/F (89,7%) e NCR61/F (89,4%). Com 0h de câmara úmida, obteve-se maior valor de REP, que se reduziu com aumento do intervalo de duração da câmara úmida (Figura 4).

Na segunda execução, quanto ao NMC detectou-se efeito significativo de isolados ($P<0,0001$), mas não de intervalo de duração da câmara úmida, nem da interação isolados-intervalo de duração da câmara úmida. Todos os isolados diferiram da testemunha

(207,467). O NMC nos discos foliares tratados com o isolado NCR60/F (0,722) foi menor, mas não diferiu do com os isolados NCR19/F (1,178), Pg 88-710 (1,17) e NCR61/F (2,394). O NMC nos discos foliares tratados com o isolado NCR62/F (2,456) foi o maior, porém não diferiu do com os isolados NCR19/F, Pg 88-710 e NCR61/F.

Quanto à REP, não houve efeito significativo de isolados de *C. rosea*, nem da interação isolado-intervalo de duração da câmara úmida. Todos os isolados de *C. rosea* reduziram a esporulação de *B. cinerea* de forma similar, A duração de câmara úmida influenciou a REP ($P=0,007$), entretanto a variação foi pequena (Figura 4).

Quanto à SFCA, não houve efeito significativo de isolados, de intervalo de câmara úmida nem da interação isolado-intervalo de duração da câmara úmida. A SFCA foi alta em todos os intervalos de duração da câmara úmida (Figura 3). Quanto à AACEA não se detectou efeito significativo de isolados de *C. rosea*.

3.3 Supressão da esporulação de *Botrytis cinerea* por *Clonostachys rosea* em diferentes temperaturas

Nas duas execuções do experimento, *B. cinerea* não esporulou nos discos foliares mantidos a 25 ou 30°C (Figura 5). Por essa razão, os dados para o NMC, destes tratamentos não foram incluídos nas análises estatísticas. O valor máximo de NMC foi registrado na testemunha, a 20°C (Figura 5). Na primeira execução, detectou-se efeito significativo da interação isolado- temperatura ($P<0,0001$). A 10°C, o NMC nos discos foliares tratados com *C. rosea* não diferiu da testemunha (Tabela 2). A 15°C, o NMC nos discos foliares tratados com os isolados Pg 88-710 e NCR60/F não diferiu da testemunha e os demais foram inferiores (Tabela 2). A 20°C, o NMC foi menor nos discos foliares tratados com *C. rosea* (Tabela 2).

Quanto à SFCA, obteve-se efeito significativo somente da temperatura ($P<0,0001$). A 10°C, os isolados de *C. rosea* não esporularam. Houve aumento da SFCA com incremento da temperatura, atingindo máximo a 25°C (Figura 6). Quanto à AACEA não houve efeito significativo de isolados de *C. rosea*.

A REP foi influenciada somente pela temperatura ($P<0,0001$). A eficiência dos isolados aumentou com o incremento da temperatura. A 10°C, os isolados de *C. rosea* não

reduziram a esporulação de *B. cinerea* (REP = -121,2%) e a 15°C e a 20°C, a REP foi 37,1% e 97,2%, respectivamente.

Na segunda execução, detectou-se efeito significativo da interação temperatura e isolado (P=0,0008), no NMC. A 10°C, o NMC nos discos foliares tratados com *C. rosea* não diferiu do da testemunha (Tabela 2). A 15 e 20°C, o NMC de todos os isolados diferiu do da testemunha (Tabela 2).

A SFCA foi influenciada somente pela temperatura (P<0,0001). Os isolados de *C. rosea* não esporularam a 10°C. A SFCA aumentou com incremento da temperatura atingindo máximo a 25°C (Figura 6).

Quanto à REP, obteve-se efeito significativo somente da temperatura (P<0,0001). A 10°C os isolados de *C. rosea* não reduziram a esporulação de *B. cinerea* (REP = -176,6%). A 15°C e a 20°C, a REP foi 72,3% e 85,7%, respectivamente.

4. Discussão

A presença de *B. cinerea* em tecidos de morangueiro não afetou a colonização da superfície foliar pelos isolados de *C. rosea*. A colonização foliar obtida com os isolados neste trabalho foi semelhante à obtida no Capítulo 1, quando as folhas de morangueiro não foram inoculadas com o patógeno. Esperavam-se efeitos diferenciados, porque o principal mecanismo de controle de *B. cinerea* por *C. rosea* é a competição na colonização dos tecidos senescentes ou mortos (Sutton et al., 1997; Yu & Sutton, 1997; Kohl & Fokkema, 1998; Morandi et al. 2001). Com a presença de *B. cinerea*, o antagonista teria que competir com o patógeno na colonização dos tecidos. Em folhas de roseira, quando *C. rosea* foi aplicado junto com *B. cinerea* e outros fungos presentes naturalmente na superfície foliar (*Alternaria alternata*, *Penicillium sp.* e *Aspergillus sp.*) obteve-se menor colonização foliar com o antagonista (Morandi et al., 2000).

Todos os isolados de *C. rosea* estabeleceram-se e suprimiram a esporulação de *B. cinerea* em folhas de morangueiro submetidas a intervalos de 0 a 48h de câmara úmida após aplicação do antagonista. Os resultados obtidos foram opostos aos obtidos em folhas de framboesa (Yu & Sutton, 1998). Nestas, com menos de 8h de molhamento foliar, *C. rosea* não afetou a esporulação de *B. cinerea* em temperaturas variando de 10 a 20°C. As diferenças podem ser decorrentes em vista de os discos foliares de framboesa terem sido

desinfestados antes da inoculação com *B. cinerea* e de o antagonista ter-se desenvolvido como epífita (Yu & Sutton, 1997; Sutton et al., 1997), o que pode ter contribuído para a competição com *B. cinerea*.

Os isolados de *C. rosea* sobreviveram em folhas de morangueiro e reduziram a esporulação de *B. cinerea* em todos intervalos de início da câmara úmida. Com 36h de atraso, a eficiência dos isolados foi menor, provavelmente associada ao início do processo de senescência dos tecidos de morangueiro antes do plaqueamento, o que favoreceu o desenvolvimento de *B. cinerea*. Os resultados obtidos diferem dos obtidos em folhas de cebola (Kohl et al., 1995), nas quais com 16h de interrupção de câmara úmida a eficiência de *C. rosea* em reduzir esporulação de *B. cinerea* foi menor. Diferenças entre os isolados de *C. rosea* e entre os tecidos de morangueiro e de cebola, devem ser consideradas na comparação dos resultados destes estudos.

A temperatura foi a variável mais limitante ao desenvolvimento de isolados de *C. rosea* e a supressão da esporulação de *B. cinerea* por esses isolados. A temperatura tem sido limitante para a atividade de outros agentes de biocontrole, inclusive *C. rosea* em outros hospedeiros (Sutton & Peng, 1993; Elad & Zimand, 1993; Shtienberg & Elad, 1997; Sutton et al. 1997; Yu & Sutton, 1998; Kohl et al., 1999; Guetsky et al., 2001). A 10°C os isolados não colonizaram as folhas e não foram capazes de competir com *B. cinerea*, contrariando resultados obtidos por Sutton & Peng (1993). Os resultados se aproximam dos obtidos em folhas de begônia, ciclamen e gerânio (Sutton et al., 1997). Os mesmos autores obtiveram diferenças entre a competição em folhas e flores: a baixas temperaturas, *C. rosea* foi mais afetado pela temperatura em pétalas que em folhas. Essa observação ressalta a necessidade de se conduzirem novos experimentos quanto ao efeito da temperatura na competição de *C. rosea* com *B. cinerea* em flores de morangueiro, visto a importância destes órgãos para ocorrência do mofo cinzento em frutos (Maas, 1998; Boff et al., 2001).

Em períodos de temperaturas baixas, deve-se preconizar a integração do controle biológico a outras práticas para o manejo do mofo cinzento. A redução da eficiência de *C. rosea* em temperaturas baixas pode limitar o controle biológico de *B. cinerea*. Assim, torna-se necessário utilizar medida de controle mais eficiente, como o químico integrado a outras medidas de controle. Uma possibilidade é o desenvolvimento de sistemas de previsão para direcionar essa integração, o que aumentou a eficiência do controle biológico e do químico,

por reduzir a pressão de seleção sobre a população do patógeno (Shtienberg & Elad, 1997). Outra alternativa seria a utilização de misturas de agentes de biocontrole contendo antagonistas mais adaptados a temperaturas baixas (Guetsky et al., 2001).

A 20°C, condição ótima de temperatura para *B. cinerea* (Jarvis, 1992), os isolados de *C. rosea* foram supressivos a *B. cinerea*. Efeito semelhante foi relatado anteriormente com outros isolados do antagonista e em outras culturas (Peng & Sutton, 1991; Sutton & Peng, 1993; Sutton et al., 1997; Tatagiba et al., 1998; Kohl et al., 1999; Morandi et al., 2000, 2001, 2003; Szandala & Backhouse, 2001; Nobre, 2003). Em estudo realizado em casa de vegetação, constatou-se que os requerimentos ecológicos de *B. cinerea* e *C. rosea* são semelhantes (Morandi et al., 2003). Nas condições em que foram realizados os experimentos, a temperatura média diária variou de 15 a 20°C, a máxima de 23 a 29°C e a mínima de 10 a 13°C (Morandi et al., 2003). O maior crescimento do antagonista em períodos de temperatura mais alta pode ter compensado seu baixo crescimento em temperaturas mais baixas. Portanto, em condições comerciais, considerando a variação de temperatura, espera-se o antagonista possa competir com *B. cinerea*, mesmo a temperaturas baixas. Outra prática que poderá ser empregada é manipular a temperatura nas estufas, de modo a favorecer o antagonista.

Mesmo em condições desfavoráveis ao patógeno, deve-se utilizar o antagonista para evitar infecções. A baixa esporulação de *B. cinerea* a 25 e 30°C é fato conhecido (Sosa-Alvarez et al., 1995; Szandala & Backhouse, 2001), mas apesar de as temperaturas altas desfavorecerem esporulação, pode ocorrer infecção (Araújo, 1995; Broome et al., 1995). Portanto, é importante a presença do antagonista, para competir com o patógeno no momento da germinação dos conídios.

A capacidade de esporulação *C. rosea* em diferentes níveis de temperatura e umidade é importante para seu estabelecimento e dispersão na área tratada. Quanto maior a capacidade de esporulação do antagonista, maior será sua chance de se estabelecer em uma área e menor será o número de pulverizações necessárias para controle da doença. Espera-se não ocorrerem problemas como quando se aplica *Trichoderma harzianum*, que é antagonista efetivo a *B. cinerea* somente em temperaturas altas e condições de baixa umidade relativa, condições estas sub-ótimas para o patógeno (Shtienberg & Elad, 1997).

Isolados de *C. rosea* obtidos em ecossistemas brasileiros foram tão ou mais eficientes que o isolado Pg 88-710 (Peng & Sutton, 1991) em suprimir a esporulação de *B. cinerea* em folhas de morangueiro. Acredita-se que estes isolados sejam capazes de competir com *B. cinerea* em condições de cultivo comercial. Nestas situações, o antagonista estará sujeito a variações na umidade relativa do ar, no teor de umidade dos tecidos do hospedeiro, temperatura e ausência de molhamento foliar (Burrage, 1971; Kohl et al., 1995; Kohl & Fokkema, 1998). No entanto, em vista dos resultados aqui obtidos, espera-se que a eficiência dos isolados brasileiros de *C. rosea* não seja comprometida nestas situações. Há necessidade de novos trabalhos, em que se avalie a capacidade desses isolados em reduzir a esporulação de *B. cinerea* em condições de cultivo comercial e se quantifique o efeito da redução da esporulação do patógeno em restos de cultura.

5. Referências bibliográficas

- Araújo, A. E. Sobrevivência de *Botrytis cinerea* em restos de cultura, efeito de fatores de ambiente sobre o patógeno e progresso do mofo cinzento em roseiras cultivadas em casa de vegetação. Viçosa, MG: UFV, 1995. 98p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1995.
- Barak, E., Edgington, L.V., 1984. Cross-resistance of *Botrytis cinerea* to captan, thiram, chlorothalonil, and related fungicides. Canadian Journal of Plant Pathology 6, 318-320.
- Blakeman, J.P., Fokkema, N.J., 1982. Potential for biological-control of plant-diseases on the phylloplane. Annual Review of Phytopathology 20, 167-92
- Boff, P., Kastelein, P., Kraker, J.D., Gerlagh, M., Köhl, J., 2001. Epidemiology of grey mould in annual waiting-bed production of strawberry. European Journal of Plant Pathology 107, 615-24.
- Broome, J.C., English, J.T., Marois, J.J., Latorre, B.A., Aviles, J.C., 1995. Development of an infection model for *Botrytis* bunch rot of grapes based on wetness duration and temperature. Phytopathology 85, 97-2.

- Burrage, S.W. The micro-climate at the leaf surface. In: T. F. Preece; C. H. Dickinson (Eds.), Ecology of leaf surface microorganisms. London: Academic Press, 1971. p. 91-101.
- Campbell, C.L., Madden, L.V. Introduction to plant disease epidemiology. New York: John Wiley & Sons, 1990. 532 p.
- Elad, Y., 1996. Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. European Journal of Plant Pathology 102, 719-32.
- Elad, Y., Zimand, G., 1993. Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. Plant Pathology 42, 324-32.
- Fokkema, N.J., 1993. Opportunities and problems of control of foliar pathogens with micro-organisms. Pesticide Science 37, 411-16.
- Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., Dinooor, A., 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. Phytopathology 91, 621-27.
- Gullino, M.L. Chemical control of *Botrytis spp.* In: 10th International Botrytis Symposium, 1992, Heraklion, Crete, Greece. Proceedings.10th International Botrytis Symposium: 1992. p. 217-22.
- Ghini, R., 1996. Ocorrência de resistência a fungicidas em linhagens de *Botrytis cinerea*, no estado de São Paulo. Fitopatologia Brasileira 21, 285-88.
- Jarvis, W. R. Epidemiology. In: J.R. Coley-Smith; K. Verhoeff; W.R. Jarvis (Eds.), The Biology of Botrytis. London: Academic Press, 1980. p. 219-50.
- Jarvis, W.R. Managing diseases in greenhouse crops. Harrow: APS Press, 1992. 288 p.
- Johnson, K.B., Sawyer, T.L., Powelson, M.L., 1994. Frequency of benzimidazole and dicarboximide resistant strains of *Botrytis cinerea* in western Oregon small fruit and snap bean plantings. Plant Disease 78, 572-77.
- Köhl, J., Molhoek, W.M.L., Van der Plas, C.H., Fokkema, N.J., 1995. Suppression of sporulation of *Botrytis spp.* as a valid biocontrol strategy. European Journal of Plant Pathology 101, 251-59.

- Köhl, J., Lomabers-van der Plas, C.H., Molhoek, W.M.L., Kessel, G.J.T., 1999. Competitive ability of the antagonists *Ulocladium atrum* and *Gliocladium roseum* at temperatures favourable for *Botrytis* spp. development. *Biocontrol* 44, 329-46.
- Köhl, J., Van der Plas, C.H., Molhoek, W.M.L., Fokkema, N.J., 1995. 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* 101, 627-37.
- LaMondia, J.A., Douglas, S.M., 1997. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from Connecticut greenhouses to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Plant Disease* 81, 729-32.
- Maas, J.L., 1998. *Compendium of Strawberry Diseases*. APS Press, St. Paul.
- Monteiro, A.J.A. Avaliação da remoção de restos culturais e de fungicidas na intensidade do mofo cinzento em roseiras cultivadas em casas de vegetação. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa, 1996. 49 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)- Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- Morandi, M.A.B., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G., Alfenas, A.C., Barbosa, J.G., 2003. Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: a valuable component in Botrytis blight management in commercial greenhouses. *Biological Control* 26, 311-17.
- Morandi, M.A.B., Maffia, L.A., Sutton, J.C., 2001. Development of *Clonostachys rosea* and interactions with *Botrytis cinerea* in rose leaves and residues. *Phytoparasitica* 29, 103-13.
- Morandi, M.A.B., Sutton, J.C., Maffia, L.A., 2000. Effects of host and microbial factors on development of *Clonostachys rosea* and control of *Botrytis cinerea* in rose. *European Journal of Plant Pathology* 106, 439-48.
- Nobre, S.A.M. Obtenção de isolados de *Clonostachys rosea* com potencial para biocontrole de *Botrytis cinerea*. Viçosa, MG: Universidade Federal Viçosa, 2003. 75 p. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal Viçosa, 2003.
- Peng, G., Sutton, J.C., 1991. Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. *Canadian Journal of Plant Pathology* 13, 247-57.

- Shafia, A., Sutton, J.C., Yu, H., Fletcher, R.A., 2001. Influence of preinoculation light intensity on development and interactions of *Botrytis cinerea* and *Clonostachys rosea* in tomato leaves. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23, 346-57.
- Schroers, H.J., Samuels, G.J., Seifert, K.A., Gams, W., 1999. Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. *Mycology* 91, 365-85.
- Shtienberg, D., Elad, Y., 1997. Incorporation of weather forecasting in integrated, biological-chemical management of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 87, 332-40.
- Sosa-Alvarez, M., Madden, L.V., Ellis, M.A., 1995. Effects of temperature and wetness duration on sporulation of *Botrytis cinerea* on strawberry leaf residues. *Plant Disease* 79, 609-15.
- Sutton, J.C., Li, D.W., Peng, G., Yu, H., Zhang, P., Valdebenito-Sanhueza, R.M., 1997. *Gliocladium roseum*: A versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Disease* 81, 316-28.
- Sutton, J.C., Liu, W., Huang, R., Owen, G.N., 2002. Ability of *Clonostachys rosea* to establish and suppress sporulation potential of *Botrytis cinerea* in deleafed stems of hydroponic greenhouse tomatoes. *Biocontrol Science and Technology* 12, 413-25.
- Sutton, J.C., Peng, G., 1993. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. *Phytopathology* 83, 615-21.
- Szandala, E.S., Backhouse, D., 2001. Suppression of sporulation of *Botrytis cinerea* by antagonists applied after infection. *Australasian Plant Pathology* 30, 165-70.
- Tatagiba, J.S. Maffia, L.A., Barreto, R.W., Alfenas, A.C., Sutton, J.C., 1998. Biological control of *Botrytis cinerea* in residues and flowers of rose (*Rosa hybrida*). *Phytoparasitica* 26, 8-19.
- Valdebenito-Sanhueza, R.M., Sutton, J.C., Perazzolo, I., Czermainski, A.B.C., 1997. Controle biológico de *Botrytis cinerea* em morangueiros cultivados em estufa. *Fitopatologia Brasileira* 22, 69-73.

Von Stowasser, E.S., Ferreira, F.A., 1997. Avaliação de fungos para biocontrole de *Botrytis cinerea* em viveiros suspensos de Eucalipto. *Revista Árvore* 21, 147-53.

Yu, H., Sutton, J.C., 1997. Morphological development and interactions of *Gliocladium roseum* and *Botrytis cinerea* in raspberry. *Canadian Journal of Plant Pathology* 19, 237-46.

Yu, H., Sutton, J.C., 1998. Effects of inoculum density, wetness duration, and temperature on control of *Botrytis cinerea* by *Gliocladium roseum* in raspberry. *Canadian Journal of Plant Pathology* 20, 243-52.

Yourman, L.F., Jeffers, S.N., 1999. Resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in greenhouse isolates of *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 83, 569-75.

Tabela 1. Número médio de conidióforos de *Botrytis cinerea* em folhas de morangueiro. As folhas foram inoculadas com *B. cinerea* e, 24h após, tratadas com isolados de *Clonostachys rosea* ou água destilada esterilizada (testemunha) e submetidas a diferentes intervalos de duração de câmara úmida após aplicação do antagonista. Primeira execução do experimento

Tratamento	Intervalo de câmara úmida (h)					
	0	6	12	24	36	48
NCR19/F	0,3 c*	11,3**c	8,8c	44,9bc	35,1b	11,2b
Pg 88-710	4,2 b	2,3 d	33,5bc	31,2c	32,4b	30,2b
NCR62/F	5,3 b	36,1b	69,7b	90,8b	76,2b	25,8b
NCR61/F	6,1 b	9,8cd	15,7c	45,3bc	36,2b	38,8b
NCR60/F	14,4b	11,6 c	36,8bc	30,4c	41,7b	27,1b
Testemunha	306,1a	314,4a	301,9a	245,7a	264,1a	189,8 ^a

*Médias seguidas pela mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si (LSD, $\alpha=0,05$).

** número médio de conidióforos de *B. cinerea* avaliado após 12 dias de incubação

Tabela 2. Número médio de conidióforos de *Botrytis cinerea* em discos de folha de morangueiro. As folhas foram inoculadas com *B. cinerea* e, 24 h após, tratadas com isolados de *Clonostachys rosea* ou água destilada esterilizada (testemunha) e mantidas em diferentes temperaturas, em duas execuções do experimento.

Tratamento	Primeira execução			Segunda execução		
	Temperatura			Temperatura		
	10°C	15°C	20°C	10°C	15°C	20°C
NCR19/F	121,6a ¹	76,7 ² c	0,65 c	90,9ab	78,8b	40,4bc
Testemunha	68,6 ab	171,1a	211,4a	54,3 ab	220,4a	211,1a
Pg 88-710	45,7 b	123,0ab	5,0 bc	45,5 ab	65,5bc	22,2bc
NCR60/F	41,5 b	118,0 abc	5,7 bc	25,5 b	50,3bc	15,4bc
NCR62/F	39,5 b	91,8 bc	14,0 b	110,6a	64,9bc	14,6bc
NCR61/F	10,0 b	93,7 bc	3,1 c	84,2 ab	29,3 c	6,6 c

¹Médias seguidas pela mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si (LSD, $\alpha=0,05$).

²número médio de conidióforos de *B. cinerea* avaliado após 12 dias de incubação.

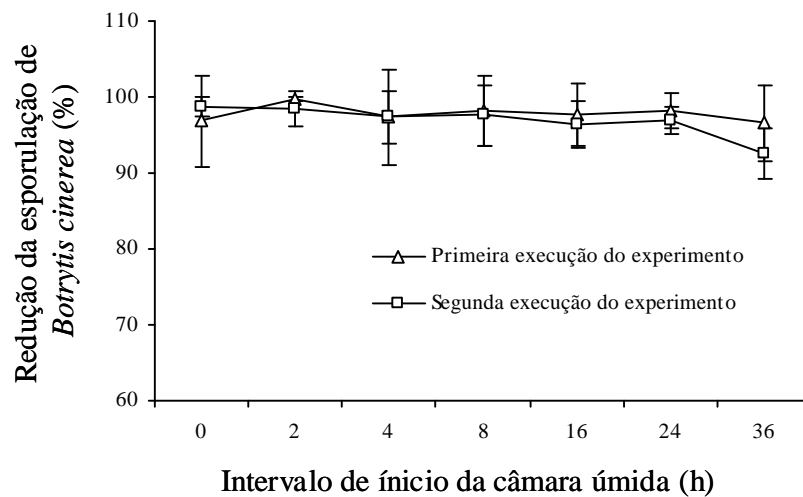


Figura 1 – Supressão da esporulação de *Botrytis cinerea* por isolados de *Clonostachys rosea* em folhas de morangueiro, submetidas a diferentes intervalos de início da câmara úmida após a aplicação do antagonista. As barras verticais representam o erro padrão da média

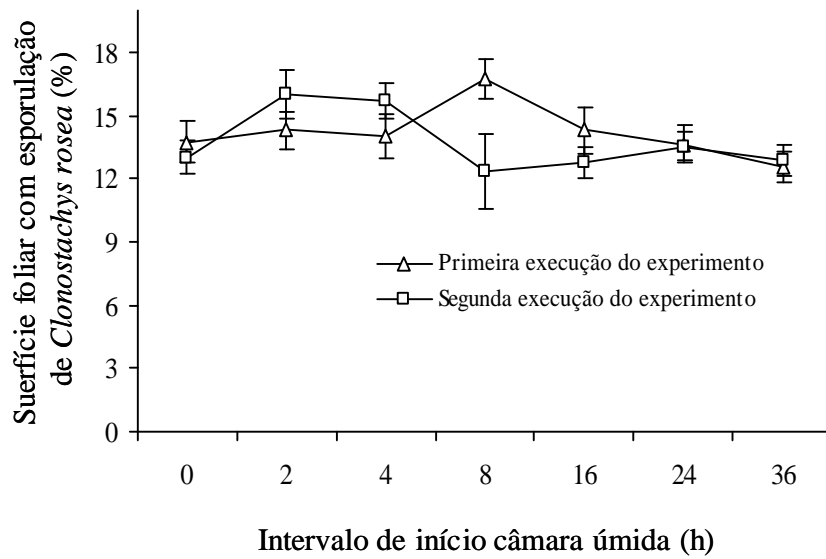


Figura 2- Superfície com esporulação de *Clonostachys rosea* em folhas de morangueiro inoculadas com *Botrytis cinerea*, após 24h tratadas com o antagonista e submetidas a diferentes intervalos de início da câmara úmida. Barras verticais representam o erro padrão da média.

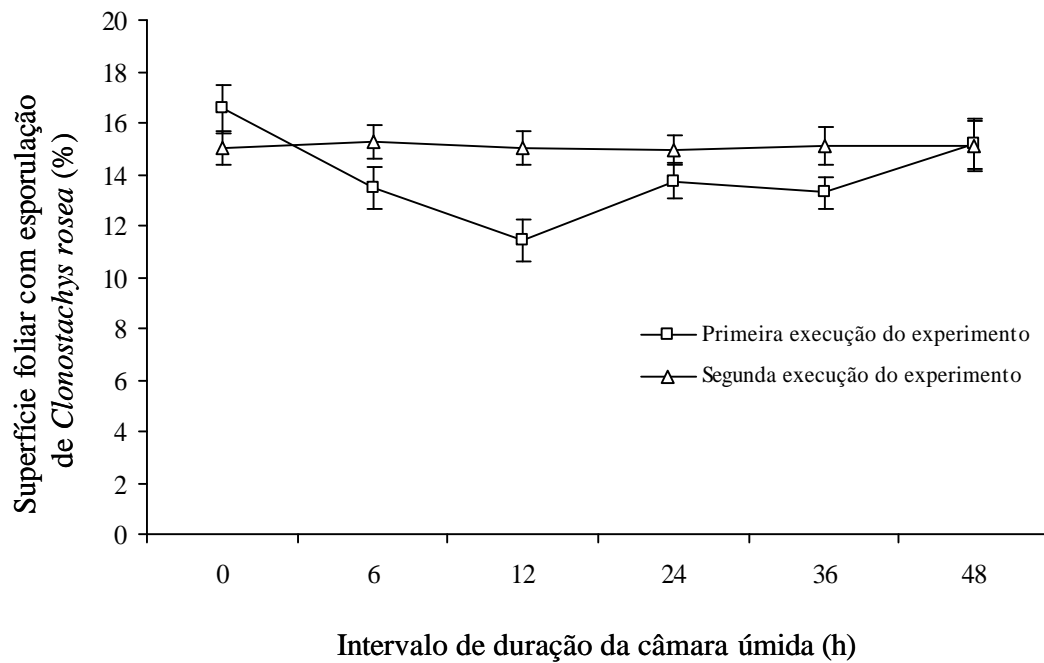


Figura 3- Superfície com esporulação de *Clonostachys rosea* em folhas de morangueiro inoculadas com *Botrytis cinerea*, após 24 h tratadas com isolados do antagonista e submetidas a diferentes intervalos de duração da câmara úmida. Barras verticais representam o erro padrão da média.

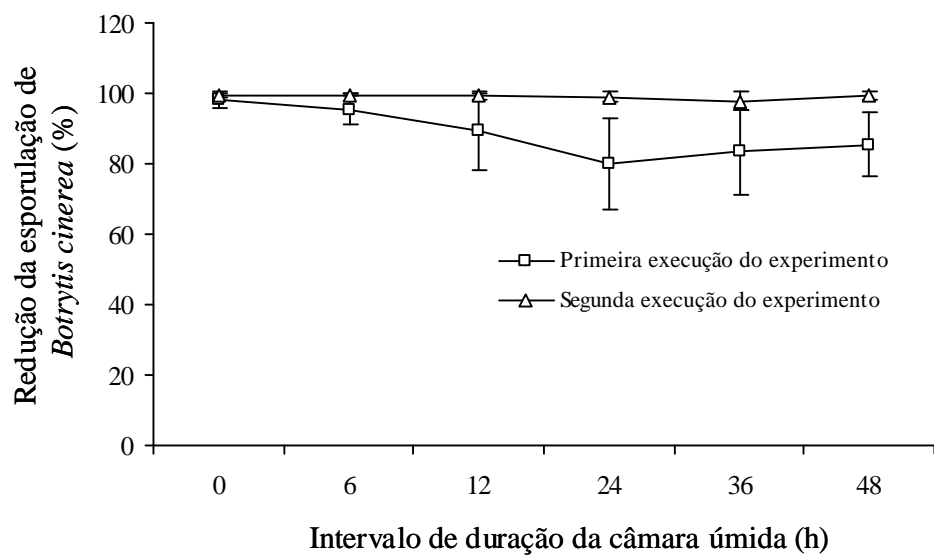


Figura 4– Supressão da esporulação de *Botrytis cinerea* por *Clonostachys rosea* em folhas de morangueiro, submetidas a diferentes intervalos de duração de câmara úmida, após aplicação do antagonista. Barras verticais representam o erro padrão da média

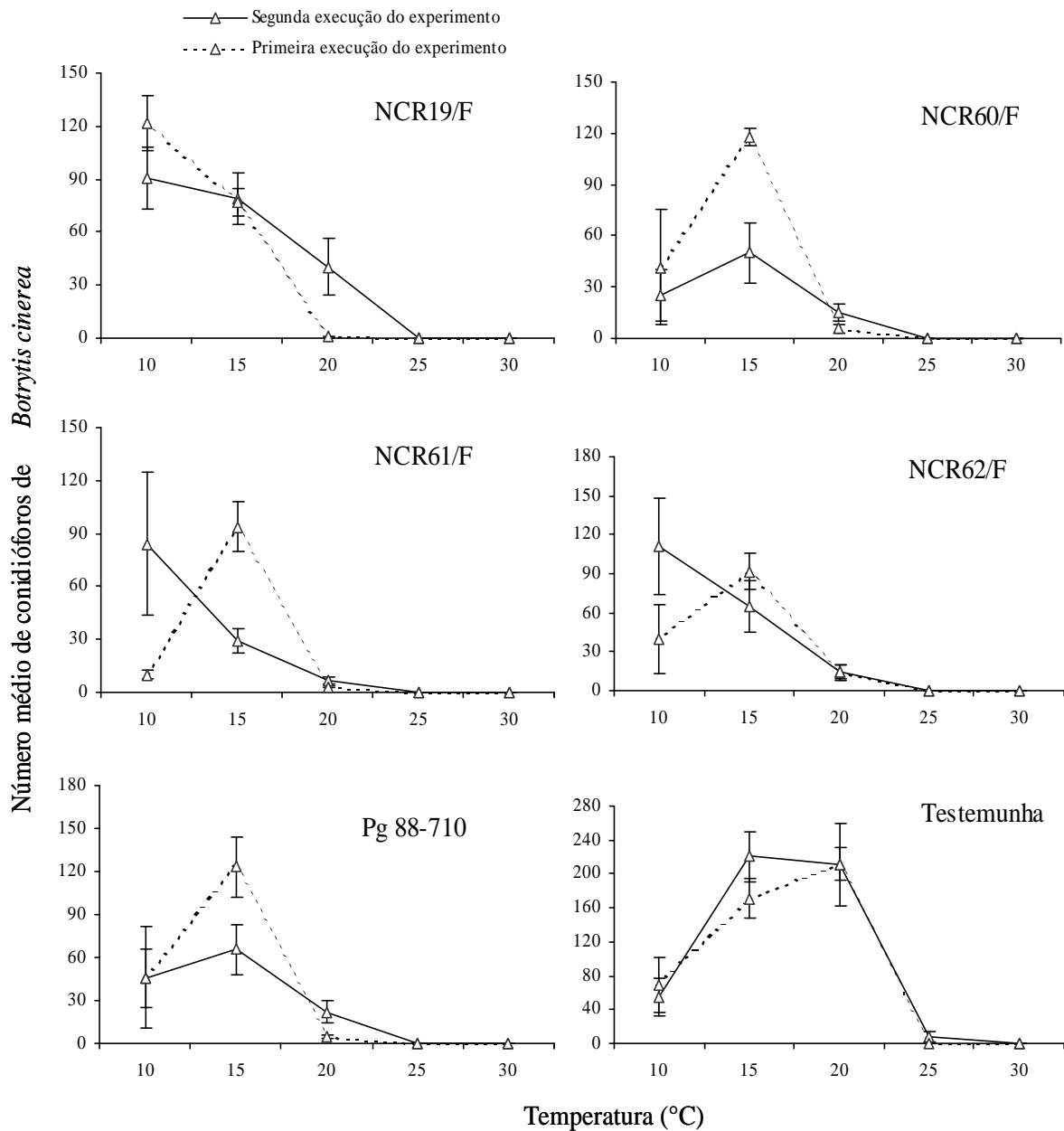


Figura 5- Número médio de conidióforos de *Botrytis cinerea* em discos foliares de morango. Folhas foram inoculadas com *B. cinerea*, após 24h retiraram-se discos que foram tratados com isolados de *Clonostachys rosea* ou água destilada esterilizada (testemunha) e mantidos em diferentes temperaturas por 12 dias. Barras verticais representam o erro padrão da média

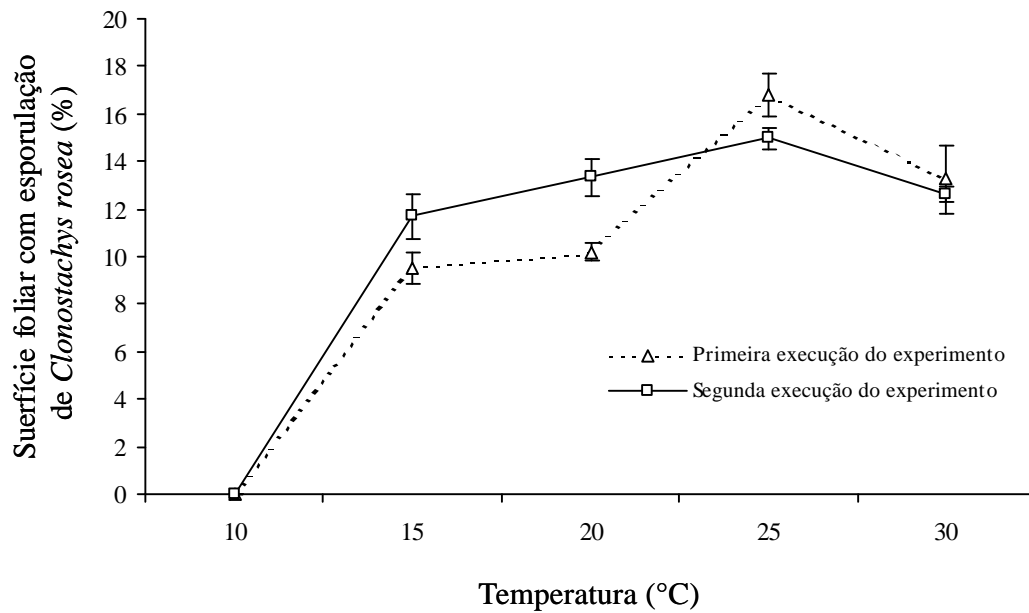


Figura 6- Superfície com esporulação de *Clonostachys rosea* em discos foliares de morangueiro, inoculados com *B. cinerea*, após 24h tratados com os isolados de *Clonostachys rosea* e mantidos em diferentes temperaturas. Barras verticais representam o erro padrão da média

CAPÍTULO 3

Dinâmica temporal de isolados de *Clonostachys rosea* e supressão da esporulação de *Botrytis cinerea* pelos isolados em folhas de morangueiro

Resumo

Em programa de pesquisa para o manejo do mofo cinzento, selecionaram-se quatro isolados de *Clonostachys rosea* (Cr), que se estabeleceram em folhas de roseira, morangueiro, eucalipto e tomateiro e nelas suprimiram a esporulação de *Botrytis cinerea* (Bc). No presente trabalho estudou-se a dinâmica temporal de cinco isolados de Cr (quatro obtidos em ecossistemas brasileiros e o isolado Pg 88-710, obtido no Canadá), assim como o antagonismo a Bc em folhas de morangueiro. Apesar de sobreviverem por 49 dias em folhas ativas, houve redução da colonização foliar: 1 dia após aplicação, a colonização foi de 16,3 a 18,3% e, aos 49 dias, foi de 3,9 a 5,5%. Em folhas de morangueiro, avaliou-se o antagonismo de isolados de Cr a Bc, em intervalos de 0 a 288h de aplicação dos isolados antes ou após a inoculação do patógeno. Quando os isolados foram aplicados antes, a redução da esporulação do patógeno variou de 47,3 a 97%, em todos os intervalos de aplicação. Quando aplicados após o patógeno, a redução da esporulação do patógeno foi, na maioria das vezes, superior a 95%, em todos os intervalos de aplicação. Estudou-se a capacidade de isolados de Cr em protegerem folhas de morangueiro da infecção por Bc. Na primeira execução do experimento, a redução na esporulação do patógeno foi de 52,3% e de 9,7%, 1 e 7 dias após aplicação dos isolados, respectivamente. Nos demais intervalos, os isolados não reduziram a esporulação do patógeno. Na segunda execução, a redução da esporulação de Bc foi de 62,6% e de 19,4%, 1 e 49 dias após aplicação dos antagonistas, respectivamente. Nas condições testadas, os isolados brasileiros de Cr foram tão ou mais eficientes que o canadense em colonizar folhas de morangueiro e nestas competir com Bc.

Abstract

Temporal dynamics of *Clonostachys rosea* isolates and suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by these isolates in strawberry leaves.

In a research program aiming to manage Botrytis blight, four *Clonostachys rosea* (Cr) isolates, capable of establishing in rose, strawberry, eucalyptus, and tomato leaves as well as suppressing *Botrytis cinerea* (Bc) sporulation on these leaves were selected. We investigated more deeply the capacity of the four isolates and isolate Pg 88-710 from Canada in colonizing and inhibiting Bc in strawberry leaf tissues. All five isolates survived in active leaves but leaf colonization decreased from 16.3-18.3% to 3.9-5.5% from 1 to 49 days after application. Each isolate was applied on strawberry leaves either before or after Bc inoculation, at intervals ranging from 0 to 288h. For all application times before Bc inoculation, reduction of pathogen sporulation varied from 47.3 to 97.0%. For most application times after inoculation, pathogen sporulation was reduced by more than 95.0%. Each isolate was applied on leaves, Bc was inoculated after 1 to 49 days (treatments weekly spaced), and pathogen sporulation was evaluated. At the first experimental run, reduction of pathogen sporulation was 52.3% and 9.7%, 1 and 7 days after Cr application, respectively; Bc sporulation was not reduced at the other treatments. At the second run, reduction of pathogen sporulation was 62.6% and 19.4%, 1 and 49 days after antagonist application, respectively. The four isolates were similar to the Canadian isolate regarding leaf colonization efficiency and antagonistic capacity to Bc.

1. Introdução

O fungo *Botrytis cinerea* Pers. ex Fries (Teleomorfo: *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel 1945), agente causal do mofo cinzento, é patógeno de ampla distribuição geográfica que causa perdas em um grande número de plantas cultivadas, principalmente sob cultivo protegido (Jarvis, 1980; 1992). O patógeno é necrotrófico e pode infectar todas as partes da planta, na maioria dos estádios de desenvolvimento (Gullino, 1992). Ademais, a obtenção de cultivares resistentes a *B. cinerea* não tem sido bem sucedida (Buttner, et al., 1994; Elad & Evensen, 1995). Em vista do exposto, é difícil implementar medidas de controle para a doença.

Entre as medidas de controle atualmente empregadas, incluem-se práticas culturais, como o controle do ambiente, eliminação de restos culturais (Jarvis, 1989, 1992; Monteiro, 1996) e o controle químico. Esse é amplamente utilizado, mas é dificultado pela ocorrência de populações de *B. cinerea* resistentes a fungicidas (Barak & Edgington, 1984; Pak et al., 1990; Gullino, 1992; Ghini, 1996; Yourman & Jeffers, 1999).

Dentre as alternativas estudadas para manejo das doenças causadas por *B. cinerea*, destaca-se o controle biológico. Um antagonista eficiente no biocontrole de *B. cinerea* é o fungo *Clonostachys rosea* (Link: Fr.) Schroers, Samuels, Siefert & Gams (Schroers et al., 1999). O antagonista reduz o desenvolvimento e esporulação de *B. cinerea* por meio de competição por nutrientes, hiperparasitismo, competição na colonização de tecidos senescentes e de tecidos mortos (Sutton et al., 1997; Yu & Sutton, 1997; Kohl & Fokkema, 1998; Morandi et al. 2001). Em experimentos conduzidos em casa de vegetação, *C. rosea* estabeleceu-se em restos culturais de roseira, nos quais suprimiu a esporulação de *B. cinerea*, em condições favoráveis ao patógeno (Morandi et al., 2003).

Nos vários trabalhos realizados objetivando o biocontrole de *B. cinerea* por *C. rosea* em condições controladas, é comum o antagonista ser aplicado antes da inoculação do patógeno (Peng & Sutton, 1991; Tatagiba et al., 1998; Yu & Sutton, 1998; Morandi et al., 2000; 2001; Nobre, 2003). Entretanto, em folhas de roseira, o isolado Pg 88-710 reduziu a esporulação de *B. cinerea* em quase 100%, quando aplicado concomitante ou 24h antes ou após o patógeno (Morandi et al., 2001). Em folhas de feijão, o antagonista foi o mais eficiente em reduzir a esporulação de *B. cinerea*, quando aplicado 5 dias após a infecção do

patógeno (Szandala & Backhouse, 2001). A capacidade de controlar o patógeno após a infecção aumenta o potencial de biocontrole do mofo cinzento por *C. rosea*.

Uma importante característica para o sucesso de um agente de biocontrole é a sua capacidade de sobreviver sob diferentes condições ambientais. Os resultados relacionados à sobrevivência de *C. rosea* em restos de cultura são contraditórios. Em folhas de roseira o antagonista sobreviveu por um mês, em temperaturas de 10 a 30°C (Morandi et al., 2001). Entretanto, em folhas de morangueiro, roseira, gerânio, petúnia, obteve-se reduzida colonização foliar por quatro isolados de *C. rosea*, após 8 dias, em condições de casa de vegetação (Nobre, 2003). Uma maneira de se aumentar o tempo de sobrevivência do antagonista seria sua aplicação em folhas ativas, para explorar a capacidade deste em se estabelecer endofiticamente (Sutton et al., 1997; Yu & Sutton, 1997; Köhl & Fokkema, 1998; Morandi et al., 2001). Contudo, há deficiência de estudos relacionados à dinâmica temporal do antagonista em tecidos ativos, assim como quanto à capacidade do mesmo em proteger as folhas da infecção por *B. cinerea*. Há trabalhos relacionados a essa estratégia conduzidos com outros antagonistas (Kohl et al., 1998, 2000; Guestky et al., 2002). Por exemplo, *Ulocladium atrum*, antagonista a *B. cinerea*, sobreviveu em folhas verdes de ciclâmen (*Cyclamen persicum*) por até 60 dias (Köhl et al., 2000).

O presente trabalho objetivou estudar: i- a dinâmica temporal de isolados de *C. rosea* em morangueiro; ii- a capacidade de isolados de *C. rosea* em proteger folhas de morangueiro da infecção por *B. cinerea* e iii- a capacidade de isolados de *C. rosea*, aplicados em diferentes intervalos, em suprimir a esporulação de *B. cinerea*.

2. Material e Métodos

Os trabalhos foram executados no Laboratório de Epidemiologia e em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da UFV. Para todos os ensaios, adotaram-se procedimentos comuns, descritos a seguir.

Utilizaram-se plantas de morango (*Fragaria ananassa* L.), 'Dover' produzidas em casa de vegetação (temperatura de, no máximo, 25°C, cultivadas em vasos plásticos de 20cm de diâmetro (4 L), contendo mistura solo: esterco bovino curtido: areia (proporção 11:4:1) tratada com brometo de metila. As plantas foram adubadas a cada 60 dias com 5g

de NPK (4:14:8)/vaso. Flores e folhas velhas eram removidas periodicamente para reduzir a chance de infecção por *B. cinerea*. Em todos os experimentos, utilizaram-se folhas verdes, completamente expandidas, com cerca de 20 a 30 dias de idade. Nos experimentos com plantas inteiras, utilizaram-se plantas com aproximadamente 6 meses de cultivo.

Em todos os experimentos, utilizaram-se quatro isolados de *C. rosea* obtidos em condições brasileiras: NCR19/F, NCR60/F, NCR61/F e NCR62/F, selecionados pela capacidade de estabelecimento e de supressão da esporulação de *B. cinerea* em folhas de morangueiro, tomateiro, roseira e eucalipto (Nobre, 2003). Para fins comparativos, incluiu-se o isolado Pg 88-710 (Peng & Sutton, 1991). Conídios de cada isolado de *C. rosea* foram produzidos em meio batata-dextrose-agar (BDA), a 25°C, sob luz branca fluorescente, 12h de fotoperíodo. Utilizou-se o isolado MoB1 de *B. cinerea*, previamente selecionado pela sua agressividade em folhas de morangueiro (Nobre, 2003). Os conídios do patógeno foram produzidos em meio BDA, a 20°C, sob luz branca fluorescente, 12h de fotoperíodo.

Após 10 a 14 dias de cultivo, os conídios de cada isolado do antagonista e do patógeno foram suspensos em água destilada esterilizada adicionada de Tween 20 (0,05% v/v), e se efetuou filtragem em duas camadas de gaze. A concentração de conídios, estimada com hemacitômetro, foi ajustada para 10^6 e 10^5 conídios.mL⁻¹, para cada isolado do antagonista e patógeno, respectivamente. As suspensões de conídios foram atomizadas nas folhas com atomizador De Vilbiss No. 15. Nos folíolos da testemunha, aplicou-se água destilada esterilizada adicionada de Tween 20 (0,05% v/v).

Avaliou-se indiretamente a colonização dos tecidos por *B. cinerea* e isolados de *C. rosea*, quantificando-se a intensidade de esporulação de cada fungo nos tecidos foliares de morangueiro. Para quantificar a esporulação, discos de folha foram transferidos para placas de Petri (90mm) contendo meio paraquat-cloranfenicol-agar (PCA) (Peng & Sutton, 1991), incubando-se a 20°C, por 10-12 dias. Estimou-se a percentagem da área dos discos com esporulação de *C. rosea* e *B. cinerea*, sob microscópio estereoscópico. Para *C. rosea*, utilizou-se a escala de notas: 0= 0; 1= 0-3; 2= >3-6; 3= >6-12; 4= >12-25; 5= >25-37; 6 = >37-50; 7 = >50% da área dos discos colonizados (Nobre, 2003). Para *B. cinerea*, utilizou-se a escala de notas: 0=0; 1=1-12; 2=13-24; 3=25-48; 4=49-100; 5=101-200; 6=201-300; 7=301-400 conidióforos por disco de folha (Peng & Sutton, 1991). Para análise estatística, os valores de cada classe foram convertidos para o ponto médio do intervalo. Os dados de

cada repetição foram representados pela média dos 15 discos foliares. Cada um dos experimentos descritos a seguir foi executado por duas vezes.

2.1 Estabelecimento e sobrevivência de *Clonostachys rosea* em plantas inteiras de morango

Em folhas completamente expandidas de morangueiros, atomizou-se suspensão de conídios de *C. rosea*. As plantas permaneceram em câmara de nevoeiro a 25°C e fotoperíodo de 12h e, após 24 h, foram reconduzidas à casa de vegetação. Para avaliar o estabelecimento de *C. rosea*, amostraram-se folíolos após 1, 7, 14, 21, 28, 36, 42 e 49 dias da aplicação. Para tanto, de cada repetição, coletaram-se dois folíolos, dos quais confeccionaram-se 15 discos (1cm de diâmetro), que foram transferidos para meio PCA, e se quantificou a colonização pelo antagonista. Para detectar eventuais contaminações externas com *C. rosea*, naturalmente presentes no filoplano do morangueiro (McLean et al., 1992), incluiu-se um tratamento testemunha, em cujas folhas atomizou-se água destilada esterilizada adicionada de Tween 20 (0,05% v/v). Os dados deste tratamento não foram incluídos nas análises estatísticas.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (isolados do antagonista) e três repetições (duas plantas de morango= uma repetição).

2.2 Supressão da esporulação de *Botrytis cinerea* pela aplicação de *Clonostachys rosea* em plantas inteiras

Em folhas completamente expandidas de morangueiros, atomizou-se de suspensão de conídios de *C. rosea*. As plantas permaneceram em câmara de nevoeiro a 25°C e fotoperíodo de 12h e, após 24 h, foram reconduzidas à casa de vegetação. Amostraram-se folíolos após 1, 7, 14, 21, 28, 36, 42 e 49 dias da aplicação dos isolados de *C. rosea*. Para tal, de cada repetição, coletaram-se dois folíolos, os quais foram acondicionados em caixas tipo gerbox, forradas com espuma molhada coberta com tela plástica (malha = 2mm) e inoculados com *B. cinerea*. As caixas permaneceram em câmara de crescimento a 20 °C, 12h de fotoperíodo e, após 24h, confeccionaram-se 15 discos (1 cm de diâmetro) dos

folíolos, os quais foram plaqueados em meio PCA, e se quantificou a colonização por *B. cinerea* e *C. rosea*.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos (isolados do antagonista, além da testemunha) e três repetições (duas plantas de morango= uma repetição).

2.3 Supressão da esporulação de *Botrytis cinerea* em diferentes intervalos de aplicação de *Clonostachys rosea*

2.3.1 Aplicação do antagonista antes do patógeno

Cada isolado do antagonista foi aplicado nos intervalos de 0, 24, 48, 72, 120, 168 e 288 h antes da inoculação de *B. cinerea*. Para tanto, atomizou-se suspensão de conídios de *C. rosea* em folíolos acondicionados em caixas tipo gerbox, forradas com espuma molhada coberta com tela plástica, malha de 2mm. As caixas permaneceram em câmara de crescimento a 20 °C, 12 h de fotoperíodo. As caixas, após 24 h de câmara úmida para estabelecimento do antagonista, permaneceram abertas das 8:00 às 20:00 e fechadas das 20:00 às 8:00. Completado o intervalo de aplicação do antagonista, inoculou-se o patógeno nos folíolos, os quais foram mantidos em câmara úmida e, após 24 h, foram secos ao ar por 30 minutos. Em seguida, para cada repetição, confeccionaram-se 15 discos (1 cm de diâmetro) dos folíolos, os quais foram transferidos para meio PCA, e se quantificou a colonização por *B. cinerea* e *C. rosea*.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com sete intervalos de aplicação do antagonista, seis tratamentos (cinco isolados do antagonista, além da testemunha) e três repetições (um gerbox com dois folíolos = uma repetição).

2.3.2 Aplicação do antagonista após o patógeno

Cada isolado do antagonista foi aplicado nos intervalos de 0, 24, 48, 72, 120, 168 e 288 h, após a inoculação de *B. cinerea*. Folíolos acondicionados em caixas tipo gerbox, forradas com espuma molhada coberta com tela plástica (malha = 2mm), foram inoculados

com *B. cinerea* e mantidos em condições de câmara úmida, durante 24 h. As caixas permaneceram em câmara de crescimento a 20°C, 12h de fotoperíodo, onde permaneceram abertas das 8:00 às 20:00 e fechadas das 20:00 às 8:00. Completado o intervalo de tempo para aplicação do antagonista, atomizou-se suspensão de conídios de cada isolado de *C. rosea* nos folíolos, os quais foram mantidos em câmara úmida. Após 24h da aplicação de *C. rosea*, os folíolos foram secos ao ar por 30 min e, para cada repetição, confeccionaram-se 15 discos (1cm de diâmetro) dos folíolos, os quais foram transferidos para meio PCA, e se quantificou a colonização por *B. cinerea* e *C. rosea*.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com sete intervalos de aplicação do antagonista, seis tratamentos (cinco isolados do antagonista, além da testemunha) e com três repetições (um gerbox com dois folíolos = uma repetição).

2.4 Análise dos dados

Para as análises estatísticas, utilizou-se o programa SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., Cary, NC). Nos experimentos que envolveram plantas inteiras, nas análises compararam-se a área abaixo da curva de esporulação de *B. cinerea* (AACEP) e de *C. rosea* (AACEA) (Morandi *et al.*, 2003). Nos experimentos em que se compararam os intervalos de aplicação, calculou-se a percentagem de supressão da esporulação de *B. cinerea* (REP) por *C. rosea* em relação ao tratamento testemunha, utilizando-se a equação: $REP = [(C-c)/C] * 100$, na qual C= número médio de conidióforos de *B. cinerea* na testemunha, c= número médio de conidióforos de *B. cinerea* nos discos foliares tratados com cada isolado de *C. rosea*. Efetuou-se análise de variância dos dados da superfície foliar com esporulação de *C. rosea* (SFCA), número médio de conidióforos de *B. cinerea* (NMC), AACEP, AACEA e da percentagem de supressão de *B. cinerea* (REP). Para atender às pressuposições para análise de variância, transformaram-se (raiz quadrada) os dados do NMC. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de diferença mínima significativa (Fisher LSD $\alpha=0,05$).

3. Resultados

3.1 Estabelecimento e sobrevivência de *Clonostachys rosea* em plantas inteiras de morango

Nas duas execuções do experimento, obtiveram-se tendências similares. Em geral, a SFCA foi maior 1 dia após a aplicação dos isolados, reduziu ao longo do tempo, e atingiu menores valores aos 49 dias da aplicação dos isolados (Figura 1). Ocorreu maior redução da SFCA com o isolado NCR19/F aos 14 dias da aplicação (Figura 1). Com os demais isolados, a redução da SFCA foi menor. Em ambas as execuções, a AACEA não diferiu entre os isolados de *C. rosea*.

3.2 Supressão da esporulação de *Botrytis cinerea* pela aplicação de *Clonostachys rosea* em plantas inteiras

Na primeira execução, os isolados de *C. rosea* reduziram o NMC 1 dia após a aplicação: houve 34,6%, 48,7%, 49%, 62,4% e 67% de redução com os isolados NCR19/F, NCR62/F, Pg 88-710, NCR60/F e NCR61/F, respectivamente. Com o incremento do intervalo de amostragem, houve tendência de aumento no NMC para todos os isolados, exceto o NCR62/F. Após 42 e 47 dias, o NMC foi reduzido em todos os tratamentos, inclusive na testemunha (Figura 2).

Houve diferença significativa ($P= 0,038$) entre os tratamentos quanto aos valores da área abaixo da curva de esporulação de *B. cinerea* (AACEP). A AACEP foi mais alta na testemunha (2465,2 % .dia) e com os isolados NCR60/F (1936,6 % .dia) e NCR19/F (1791 % .dia). Menores valores de AACEP foram registrados com os isolados NCR62/F (620,3 % .dia), Pg 88-710 (1178,6 % .dia) e NCR61/F (1217,1 % .dia). Não houve diferenças entre os valores de AACEP relativos aos isolados NCR60/F, NCR19/F, Pg 88-710 e NCR61/F.

A SFCA relativa aos isolados NCR19/F, NCR60/F e NCR61/F foi maior 1 dia após sua aplicação e se reduziu com o tempo. Para os isolados NCR62/F e Pg 88-710 houve uma menor redução da SFCA com o intervalo de amostragem (Figura 2). Os isolados não diferiram quanto aos valores de AACEA.

Na segunda execução do experimento, o NMC foi reduzido por todos os isolados de *C. rosea* em relação à testemunha (Figura 3). Houve efeito significativo ($P= 0,021$) dos

tratamentos quanto aos valores de AACEP, que foi maior na testemunha (2163 % .dia) e não diferiu entre os isolados NCR60/F (1324,66 % .dia), Pg 88-710 (1087,2 % .dia), NCR62/F (1027,2 % .dia), NCR61/F (892,6 % .dia) e NCR19/F (625,5 % .dia).

A SFCA para os isolados de *C. rosea* reduziu com o intervalo de amostragem (Figura 3). A redução da SFCA dos isolados NCR61/F e NCR62/F foi menor (figura 3). Os isolados não diferiram quanto aos valores de AACEA.

3.3 Supressão da esporulação de *Botrytis cinerea* em diferentes intervalos de aplicação de *Clonostachys rosea*

3.3.1 Aplicação do antagonista antes do patógeno

Na primeira execução, houve interação entre isolados de *C. rosea* e intervalos de aplicação no NMC ($P= 0,001$). Excetuando-se o último intervalo de aplicação, nos demais o NMC foi menor nos folíolos tratados com isolados de *C. rosea*. Quando se aplicou o antagonista concomitante ao patógeno, o NMC foi maior com o isolado NCR60/F e os demais não diferiram entre si (Tabela 1). Aplicando-se o antagonista 24 h antes, com o isolado NCR19/F obteve-se menor NMC, que não diferiu do NMC de Pg 88-710; 48 h antes, os isolados NCR60/F e NCR19/F resultaram em menor NMC, que não diferiu do obtido com os isolados NCR61/F e Pg 88-710; 72 h antes, o isolado NCR19/F resultou em menor NMC, que não diferiu do dos isolados NCR60/F, Pg 88-710 e NCR61/F; 120 h antes, o isolado NCR19/F resultou em menor NMC, não diferente do NMC de NCR60/F; e, 168 h antes, o isolado NCR19/F resultou em menor NMC, que não diferiu do NMC dos isolados Pg 88-710, NCR60/F e NCR61/F (Tabela 1). Para cada isolado de *C. rosea*, obtiveram-se pequenas diferenças entre intervalos de aplicação no NMC (Figura 4). Com o isolado NCR61/F, Pg 88-710 e NCR62/F obteve-se tendência de aumento do NMC com incremento do intervalo de aplicação (Figura 4). Na testemunha obteve-se tendência a redução do NMC com o intervalo de aplicação (Figura 4).

Todos os isolados de *C. rosea* sobreviveram de forma similar. Quanto à SFCA, não se detectaram efeitos significativos de isolados de *C. rosea*, intervalos de aplicação do antagonista e da interação isolados - intervalos de aplicação. A SFCA entre os isolados de *C. rosea* variou de 11,6% a 14,9%.

Todos os isolados de *C. rosea* reduziram a esporulação de *B. cinerea* de forma similar, e não se detectaram efeitos significativos dos isolados nem da interação isolado-intervalo de aplicação, mas detectou-se efeito do intervalo de aplicação na REP ($P < 0,0001$). A REP foi maior na aplicação concomitante patógeno-antagonista (90,3%) e menor quando o antagonista foi aplicado 288 h antes do patógeno (53,1%).

Na segunda execução, houve efeito significativo da interação isolado - intervalo de aplicação ($P = 0,0004$) no NMC. Em todos os intervalos de aplicação, o NMC foi menor nos folíolos tratados com os isolados de *C. rosea* (Tabela 1). Na aplicação do antagonista concomitante ao patógeno, o NMC foi menor com os isolados NCR61/F, Pg 88-710 e NCR19/F, não diferindo do NMC do isolado NCR60/F. Aplicando-se o antagonista 24 h antes, o isolado Pg 88-710 resultou em menor NMC, não diferindo do NMC de NCR61/F; 48 h antes, o isolado NCR61/F resultou em menor NMC, que não diferiu dos isolados Pg 88-710 e NCR60/F; 72 h antes, os isolados NCR19/F, Pg 88-710, NCR61/F e NCR60/F resultaram em menor NMC; 120 h, antes os isolados NCR60/F, Pg 88-710 e NCR61/F resultaram em menor NMC, que não diferiu do NMC do isolado NCR62/F; 168 h antes, o isolado NCR61/F resultou em menor NMC, que não diferiu dos isolados NCR60/F, Pg 88-710 e NCR62/F; e, 288 h antes, os isolados Pg 88-710, NCR60/F, NCR61/F e NCR19/F resultaram em menor NMC (Tabela 1). Com os isolados NCR19/F e NCR62/F obtiveram-se tendências de incremento do NMC com aumento do intervalo de aplicação (Figura 4). Com o isolado NCR60/F houve aumento do NMC com intervalo de 24h, porém com intervalos maiores houve decréscimo no NMC (Figura 4). O NMC com os isolados NCR61/F e Pg 88-710 foi reduzido em todos intervalos de aplicação (Figura 4). Similar ao obtido na primeira execução, houve tendência de redução do NMC na testemunha com aumento do intervalo de aplicação (Figura 4).

Detectou-se efeito da interação isolado-intervalo de aplicação ($P = 0,005$) na SFCA. Aplicando-se o antagonista 48 h antes do patógeno, a SFCA foi menor com os isolados NCR19/F (7,5%) e Pg 88-710 (7,6%), e não diferiu da com os isolados NCR62/F (8,7%) e NCR60/F (8,8%); maior SFCA foi com o isolado NCR61/F (12,5%), que não diferiu da dos isolados NCR62/F e NCR60/F. Aplicando-se 72 h antes, a SFCA foi menor com o isolado NCR62/F (3,6%) e maior para o isolado NCR19/F (17,8%), contudo não diferiu da do isolado NCR60/F (15,9%). Para os isolados Pg 88-710 (11,5%) e NCR61/F (12,4%) a

SFCA foi intermediária, contudo não diferiu da do isolado NCR60/F. Com intervalo de aplicação de 288h, a SFCA foi menor para os isolados NCR62/F (6,6%) e NCR19/F (8,8%); foi maior para os isolados NCR60/F (18,1%), Pg 88-710 (16,0%) e NCR61/F (14,0%), e não diferiu entre os isolados NCR61/F e NCR19/F. Com os intervalos de aplicação 0, 24, 120 e 168h, não houve efeito de isolados de *C. rosea* na SFCA. Com o intervalo de 0h a SFCA variou entre 12 e 17,9%, com 24h variou entre 9,4 e 15,5 %, com 120h variou entre 11,3 e 15,2% e com 168h a SFCA variou entre 9,2 e 17,6%.

Detectou-se efeito significativo da interação isolado-intervalo de aplicação ($P=0,0002$) na REP. Com intervalo de 24h, a REP foi menor para os isolados NCR60/F (57,9%) e NCR62/F (59,4%) e maior para os isolados Pg 88-710 (97,0%), NCR61/F (94,4%) e NCR19/F (82,7%). Com 72h, a REP foi menor para o isolado NCR62/F (49,2%) e maior para os isolados NCR19/F (96%), Pg 88-710 (94,6%), NCR61/F (91,1%) e NCR60/F (90,9%). Com 288h, a REP foi menor para o isolado NCR62/F (42,3%) e maior para os isolados Pg 88-710 (91,4%), NCR60/F (87,7%), NCR61/F (77,1%) e NCR19/F (76,2%). Com os intervalos de aplicação 0h, 48h, 120h e 168h, não houve efeito de isolados de *C. rosea* na REP. Com 0h, a REP variou entre 82,6 e 97%; com 48h, variou entre 53 e 89%; com 120h, variou entre 75,8 e 94,9% e, com 168h, variou entre 61,3 e 93,3%.

3.3.2 Aplicação do antagonista após o patógeno

Na primeira execução, detectou-se efeito significativo da interação isolado-intervalo de aplicação ($P=0,0013$) no NMC. Em todos os intervalos de aplicação, o NMC foi menor nos folíolos tratados com isolados de *C. rosea* que na testemunha (Tabela 2). Com a aplicação concomitante do antagonista e patógeno, o NMC não diferiu entre os isolados (Tabela 2). Aplicando-se o antagonista 24 h após o patógeno, o NMC foi maior com o isolado NCR62/F; nas aplicações às 48, 72, 120, 168 e 288h após a inoculação, NMC não diferiu entre os isolados (Tabela 2). Para cada isolado de *C. rosea*, obtiveram-se pequenas diferenças entre os intervalos de aplicação no NMC (Figura 5).

Para SFCA, houve efeito significativo dos isolados de *C. rosea* ($P=0,002$) e dos intervalos de aplicação ($P=0,0055$), mas não da interação isolado-intervalo de aplicação. Obteve-se maior SFCA com os isolados NCR61/F (18,0%) e NCR60/F (16,8%) e menor

com os isolados NCR62/F (13,5%), Pg 88-710 (13,8%) e NCR19/F (15,2%), mas os valores de SFCA obtidos com os isolados NCR19/F e NCR60/F não diferiram entre si. Obtiveram-se maiores valores de SFCA nas aplicações após 168 e 288 h (18,2% e 17,08%, respectivamente) e menores valores na aplicação concomitante e após 72 h da inoculação de *B. cinerea* (13,9% e 12,4%, respectivamente).

Detectou-se efeito significativo da interação isolado-intervalo de aplicação ($P=0,0279$) na REP. Na aplicação após 120h, a REP foi menor com o isolado NCR62/F (95,1%). Com os isolados NCR61/F (99,4%), NCR60/F (99,7%), NCR19/F (99,7%) e Pg 88-710 (99,8%) ocorreram maiores valores de REP, que não diferiram entre si. Com intervalo de 0, 24, 48, 72, 168 e 288h após a inoculação, não houve efeito de isolado na REP. Com a aplicação concomitante do antagonista e patógeno, a REP variou entre 86,9 e 99,6%. Com intervalo de 24h, a REP variou entre 64,3 e 98,6%; com 48h, variou entre 97,7 e 100%; com 72h, variou entre 97,1 e 99,7%; com 168h, variou entre 97,9 e 99,4%; e, com 288h, variou entre 94,6 e 99,3%.

Na segunda execução, detectou-se efeito significativo da interação isolado-intervalo de aplicação no NMC ($P=0,0079$). Em todas as épocas de aplicação, o NMC foi menor nos folíolos tratados com isolados de *C. rosea* que na testemunha (Tabela 2). Com a aplicação concomitante do antagonista e patógeno, os isolados Pg 88-710, NCR61/F, NCR60/F e NCR19/F resultaram em menor NMC (Tabela 2). Na aplicação após 24h, o NMC foi menor com os isolados NCR60/F, NCR61/F e NCR62/F; após 48 h, não houve diferença entre os valores de NMC para todos os isolados; após 72 h, o NMC foi menor com os isolados NCR19/F, NCR61/F e NCR60/F; após 120, 168 e 288 não houve diferença entre os valores de NMC para todos os isolados (Tabela 2). Similar ao obtido na primeira execução, para cada isolado de *C. rosea*, obtiveram-se pequenas diferenças no NMC entre os intervalos de aplicação (Figura 5). Para a testemunha, houve tendência de redução do NMC com incremento do intervalo de aplicação (Figura 5).

Detectou-se efeito significativo da interação isolado-intervalo de aplicação na SFCA ($P=0,0047$). Com intervalo de 72h, SFCA foi maior para os isolados NCR61/F (14,5%), NCR19/F (12,3%) e NCR60/F (11,9%) e menor para os isolados NCR62/F (6,9%) e Pg 88-710 (5,8%). Com intervalo de 120h, a SFCA foi maior para os isolados NCR60/F (20,9%) e NCR19/F (16,6%) e menor para os isolados Pg 88-710 (8,9%), NCR62/F (12,5%) e

NCR61/F (12,5%), contudo não diferiu entre os isolados NCR19/F, NCR61/F e NCR62/F. Com os intervalos de 0, 24, 48, 168 e 288h não foi obtido efeito significativo de isolados de *C. rosea* na SFCA. Com a aplicação concomitante, a SFCA variou entre 12,8 e 16,13%; com 24h, variou entre 9,9 e 15,4%; com 48h, variou entre 9,5 e 17,6%; com 168h, variou entre 13,5 e 16,6%; e, com 288h, a SFCA variou entre 11,4 e 16,1%.

Houve efeito da interação isolado-intervalo de aplicação na REP ($P= 0,0089$). Com intervalo de 0h a REP foi menor com o isolado NCR62/F (78,5%) e os isolados Pg 88-710 (98,2%), NCR61/F (94,8%), NCR19/F (94,3%) e NCR19/F (94,2%) apresentaram maior REP, mas não diferiram entre si. Com os intervalos de 24, 48, 72, 120, 168 e 288h, não se detectou efeito significativo de isolados *C. rosea* na REP. Com intervalo de 24h, a REP variou entre 91,7 e 99,1%; com 48h, variou entre 89,9 e 97,5%; com 72h, variou entre 94,2 e 99,1%; com intervalo de 120h, variou entre 94,4 e 99; com 168h, variou entre 96,5 e 99,6%; e com 288h, variou entre 93,4 e 99,2%.

4. Discussão

Para ser eficiente no biocontrole de patógenos da parte aérea, os antagonistas têm que se estabelecer no filoplano. Os isolados de *C. rosea* testados estabeleceram-se em morangueiros, entretanto a colonização foliar decresceu com o tempo. Aparentemente, a queda da colonização foliar segue um padrão já observado para outros agentes de biocontrole. Em folhas de morangueiro, o número de unidades formadoras de colônia de *Pichia guilhermondii* e *Bacillus mycooides* reduziu-se uma semana após serem aplicados (Guestky et al., 2002). O número de conídios de *Ulocladium atrum* em folhas verdes de ciclâmen caiu 50% após 10 dias da aplicação e se manteve estável durante 70 dias (Köhl et al., 2000). É conhecido que *C. rosea* pode se desenvolver endofítica ou epifiticamente em superfície de órgãos vegetais sadios (Yu & Sutton, 1997; Sutton et al, 1997; Nobre, 2003). No presente trabalho, provavelmente as colônias que estavam se desenvolvendo como epífitas em folhas ativas de morangueiro, sobreviveram por menos tempo, enquanto as que se estabeleceram como endofíticas sobreviveram por mais tempo, porque se encontravam de forma protegida em relação aos que estavam sobrevivendo com epífitas. Em hastes de tomateiro, o antagonista sobreviveu por 70 dias, entretanto foi feita apenas uma avaliação

(Sutton et al., 2002). Poder-se-iam criar condições para que maior quantidade de conídios germinasse e se estabelecesse nos tecidos foliares, como o desenvolvimento de formulações que contenham fontes de nutrientes, pois *C. rosea* depende de fontes externas de nutrientes para germinar (Morandi et al., 2001).

A dinâmica de colonização por *C. rosea* em folhas ativas de morangueiro diferiu da obtida em folhas senescentes de roseira. Nas folhas de roseira, o máximo de colonização foliar foi obtido aos 20 dias da aplicação (Morandi et al., 2001), enquanto no presente trabalho a colonização foliar foi máxima um dia após aplicação dos isolados. As diferenças se devem possivelmente a alterações fisiológicas que ocorreram nos tecidos durante a senescência, o que favoreceu a colonização dos tecidos pelo antagonista, em folhas de roseira. No entanto, Nobre (2003) obteve pico de colonização foliar 42h após aplicação do antagonista em folhas de roseira e morangueiro, diferenças atribuídas ao dessecamento dos tecidos. Obteve-se alta colonização de folíolos destacados com os isolados de *C. rosea*, durante os 12 dias do experimento. Neste experimento, simularam-se condições próximas às que ocorreriam em condições de campo, deixando as caixas gerbox fechadas no período noturno (simulando condição de umidade relativa mais alta), o que reduziu o dessecamento dos folíolos e provavelmente contribuiu para aumentar a sobrevivência dos isolados do antagonista.

Vários autores têm destacado a capacidade de *C. rosea* em se estabelecer endofiticamente como uma vantagem competitiva na colonização dos tecidos senescentes (Köhl & Fokkema, 1998; Morandi et al., 2001; Sutton et al., 1997; Yu & Sutton, 1997). No entanto, no presente trabalho, com a aplicação de *C. rosea* em folhas verdes não se obteve biocontrole eficiente de *B. cinerea*. Fato semelhante foi observado em folhas de ciclâmen, com o antagonista *Ulocladium atrum*, apesar de nestas a supressão ter sido maior (Kohl et al., 1998, 2000). Após uma semana da aplicação, a colonização dos tecidos por isolados de *C. rosea* decresceu e, mesmo com reduzido número de conidióforos de *B. cinerea* nos folíolos da testemunha, a redução da esporulação pelos isolados do antagonista foi baixa. O baixo número de conidióforos obtidos nos folíolos da testemunha é resultado da redução da suscetibilidade de tecidos foliares mais velhos a *B. cinerea* (Braun & Sutton, 1988; Sutton, 1990). Novos estudos com esta estratégia devem ser conduzidos e seria interessante fosse permitido haver senescência natural das folhas, porque talvez com a senescência mais lenta

dos tecidos, possa aumentar a chance para que a baixa população do antagonista nos tecidos, retome o crescimento e colonize volume maior de tecidos.

Por ser patógeno necrotrófico, *B. cinerea* infecta tecidos de folhas jovens, permanece em estágio quiescente até o início da senescência, quando retoma a colonização dos tecidos (Braun & Sutton, 1988; Sutton, 1990; Kohl et al., 1995). Sendo assim, para competir com *B. cinerea*, o antagonista deverá estar presente nos restos culturais no momento de serem colonizados pelo patógeno. Se o antagonista sobrevivesse em tecidos verdes por longos períodos de tempo, poderia se efetuar um menor número de pulverizações com o agente de biocontrole para haver supressão da esporulação do patógeno nos restos de cultura. A aplicação de *C. rosea* em folhas no início da senescência foi estratégia eficiente para reduzir a esporulação de *B. cinerea* em restos de cultura de roseira (Morandi et al., 2003). Fato semelhante ocorreu em folhas verdes de morangueiro infectadas por *B. cinerea*, nas quais o antagonista foi eficiente em reduzir a esporulação de *B. cinerea*, quando aplicado 15 dias após a inoculação do patógeno (Sutton & Peng, 1993). Há vários relatos de que a supressão da colonização e, ou, da esporulação do patógeno em restos de cultura seja estratégia válida de controle biológico (Köhl et al., 1998; Köhl et al., 1995; Morandi et al., 2003; Sutton & Peng, 1993).

Os isolados de *C. rosea* suprimiram a esporulação de *B. cinerea* quando aplicados até 280h antes ou após a inoculação do patógeno em folíolos. De modo geral, com a aplicação de *C. rosea* após o patógeno, a redução da esporulação de *B. cinerea* foi maior. Esses resultados diferiram dos obtidos em folhas de framboesa, nas quais o isolado Pg 88-710 foi mais eficiente em suprimir a esporulação de *B. cinerea* quando aplicado antes, apesar de o intervalo de aplicação ter sido de apenas 32h (Yu & Sutton, 1997). Em folhas de roseira, o mesmo isolado reduziu em quase 100% a esporulação de *B. cinerea* se aplicado 24h antes, concomitante ou 24h após inoculação do patógeno (Morandi et al., 2001) Em folhas de feijoeiro, *C. rosea* foi o único antagonista capaz de reduzir a esporulação de *B. cinerea* quando aplicado 5 dias após a infecção pelo patógeno (Szandala & Backhouse, 2001). Em condições de cultivo comercial, *C. rosea* foi eficiente em reduzir a esporulação de *B. cinerea* quando aplicado a intervalos de 15 dias (Morandi et al., 2003). No presente trabalho, quando aplicado antes do antagonista, o número de conidióforos de *B. cinerea* nos folíolos da testemunha foi menor do que quando aplicado após o

antagonista, o que pode ter contribuído para a maior redução de esporulação de *B. cinerea* pelos isolados do antagonista. Por ser patógeno necrotrófico, *B. cinerea* infectou os tecidos foliares que estavam em início de processo de senescência e iniciou a colonização mais rápido que em folhas recém-amostradas das plantas. Nestas, o patógeno provavelmente teve um período de quiescência (Sutton, 1990). A alta eficiência dos isolados em competir com *B. cinerea*, a partir de infecções já estabelecidas, dá ao antagonista uma importante vantagem competitiva na colonização de restos culturais.

Os isolados de *C. rosea* obtidos em condições brasileiras foram tão ou mais eficientes que o isolado Pg 88-710 (Peng & Sutton, 1991) em colonizar folhas de morangueiro, assim como no antagonismo a *B. cinerea*. Este fato ocorreu provavelmente porque os isolados já foram selecionados por sua capacidade de colonização foliar de diferentes espécies hospedeiras de *B. cinerea* e pela alta capacidade de competir com *B. cinerea* (Nobre, 2003).

Novos estudos relacionados à dinâmica temporal do antagonista, em tecidos verdes, devem ser conduzidos com outros hospedeiros de *B. cinerea*, mas pode-se antever respostas diferenciadas. Por exemplo, em folhas de roseira, isolados de *C. rosea* foram mais eficientes em colonizar folhas velhas (Morandi et al 2001; Nobre, 2003), enquanto que em eucalipto os mesmos isolados foram mais eficientes em colonizar folhas novas (Nobre, 2003). Se estas tendências se mantiverem em plantas, acredita-se ocorrer uma maior de colonização em plantas de eucalipto. Vários autores reportam a capacidade do antagonista em se estabelecer endofiticamente (Köhl & Fokkema, 1998; Morandi et al., 2001; Sutton et al., 1997; Yu & Sutton, 1997). Entretanto não se conhece como é a interação de *C. rosea* com as células dos tecidos foliares (Sutton et al., 1997). Assim, estudos histológicos e citológicos devem ser conduzidos para se elucidar a dinâmica da colonização dos tecidos.

5. Referências bibliográficas

Barak, E., Edgington, L.V., 1984. Cross-resistance of *Botrytis cinerea* to captan, thiram, chlorothalonil and related fungicides. Canadian Journal of Plant Pathology 6, 318-20.

- Braun, P.G., Sutton, J.C., 1988. Infection cycles and population dynamics of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. *Canadian Journal of Plant Pathology* 10, 133-41.
- Büttner, P., Koch, F., Voigt, K., Quidde, T., Risch, S., Blaich, R., Brückner, B., Tudzynski, P., 1994. Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: implications for genetic and molecular analyses. *Current Genetics* 25, 445-50.
- Elad, Y., Evensen, K., 1995. Physiological aspects of resistance to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 85, 637-43.
- Gullino, M.L. Chemical control of *Botrytis spp.* In: 10th International Botrytis Symposium, 1992, Heraklion, Crete, Greece. Proceedings.10th International Botrytis Symposium: 1992. p. 217-22.
- Ghini, R., 1996. Ocorrência de Resistência a Fungicidas em Linhagens de *Botrytis cinerea*, no estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira* 21, 285-88.
- Guetsky, R., Elad, Y., Shtienberg, D., Dinoor, A., 2002. Establishment, survival and activity of biocontrol agents *Pichia guillemontii* and *Bacillus mycoides* applied as a mixture on strawberry plants. *Biocontrol Science and Technology* 12, 705-14.
- Jarvis, W. R. Epidemiology. In: J. R. Coley-Smith; K. Verhoeff; W. R. Jarvis (Eds.), *The Biology of Botrytis*. London: Academic Press, 1980. p. 219-50.
- Jarvis, W.R. Managing diseases in greenhouse crops. Harrow: APS Press, 1992. 288 p.
- Köhl, J., Molhoek, W.M.L., Van der Plas, C.H., Fokkema, N.J., 1995. Suppression of sporulation of *Botrytis spp.* as a valid biocontrol strategy. *European Journal of Plant Pathology* 101, 251-59.
- Köhl, J., Fokkema, N.J., 1998. Strategies for biological control of necrotrophic fungal foliar pathogens. In: Boland, G.J., Kuykendall, L.D. (Eds), *Plant-Microbe Interactions and Biological Control*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 49-88.
- Köhl, J., Gerlagh, M., De Hass, B.H., Krijger, M.C., 1998. Biological control of *B. cinerea* in cyclamen with *Ulocladium atrum* and *Gliocladium roseum* under commercial growing conditions. *Phytopathology* 88, 568-74.

- Köhl, J., Gerlagh, M., Grit, G., 2000. Biocontrol of *Botrytis cinerea* by *Ulocladium atrum* in different production systems of cyclamen. *Plant Disease* 84, 569-73.
- McLean, M.A., Sutton, J.C., 1992. Mycoflora of strawberry in Ontario. *Canadian Journal of Botany* 70, 846-52.
- Monteiro, A. J. A. Avaliação da remoção de restos culturais e de fungicidas na intensidade do mofo cinzento em roseiras cultivadas em casas de vegetação. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa, 1996. 49 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)- Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- Morandi, M.A.B., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G., Alfenas, A.C., Barbosa, J.G., 2003. Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: a valuable component in Botrytis blight management in commercial greenhouses. *Biological Control* 26, 311-17.
- Morandi, M.A.B., Maffia, L.A., Sutton, J.C., 2001. Development of *Clonostachys rosea* and interactions with *Botrytis cinerea* in rose leaves and residues. *Phytoparasitica* 29, 103-13.
- Morandi, M.A.B., Sutton, J.C., Maffia, L.A., 2000. Effects of host and microbial factors on development of *Clonostachys rosea* and control of *Botrytis cinerea* in rose. *European Journal of Plant Pathology* 106, 439-48.
- Nobre, S.A.M. Obtenção de isolados de *Clonostachys rosea* com potencial para biocontrole de *Botrytis cinerea*. Viçosa, MG: Universidade Federal Viçosa, 2003. 75 p. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal Viçosa, 2003.
- Pak, H.A.; Beever, R.E.; Laracy, E.P., 1990. Populations dynamics of dicarboximide-resistant strains of *Botrytis cinerea* on grapevine in New Zealand. *Plant Pathology* 39, 501-09
- Peng, G., Sutton, J.C., 1991. Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. *Canadian Journal of Plant Pathology* 13, 247-57.
- Schroers, H.J., Samuels, G.J., Seifert, K.A., Gams, W., 1999. Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. *Mycology* 91, 365-85.

Sutton, J.C., 1990. Epidemiology and management of botrytis leaf blight of onion and gray mold of strawberry: a comparative analysis. *Canadian Journal of Plant Pathology* 12, 100-10.

Sutton, J.C., Li, D.W., Peng, G., Yu, H., Zhang, P., Valdebenito-Sanhueza, R.M., 1997. *Gliocladium roseum* : A versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Disease* 81, 316-28.

Sutton, J.C., Liu, W., Huang, R., Owen, G.N., 2002. Ability of *Clonostachys rosea* to establish and suppress sporulation potential of *Botrytis cinerea* in deleafed stems of hydroponic greenhouse tomatoes. *Biocontrol Science and Technology* 12, 413-25.

Sutton, J.C., Peng, G., 1993. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. *Phytopathology* 83, 615-21.

Sutton, J.C., Liu, W., Huang, R., Owen, G.N., 2002. Ability of *Clonostachys rosea* to establish and suppress sporulation potential of *Botrytis cinerea* in deleafed stems of hydroponic greenhouse tomatoes. *Biocontrol Science and Technology* 12, 413-25.

Szandala, E.S., Backhouse, D., 2001. Suppression of sporulation of *Botrytis cinerea* by antagonists applied after infection. *Australasian Plant Pathology* 30, 165-70.

Tatagiba, J.S. Maffia, L.A., Barreto, R.W., Alfenas, A.C., Sutton, J.C., 1998. Biological control of *Botrytis cinerea* in residues and flowers of rose (*Rosa hybrida*). *Phytoparasitica* 26, 8-19.

Yu, H., Sutton, J.C., 1997. Morphological development and interactions of *Gliocladium roseum* and *Botrytis cinerea* in raspberry. *Canadian Journal of Plant Pathology* 19, 237-46.

Yu, H., Sutton, J.C., 1998. Effects of inoculum density, wetness duration, and temperature on control of *Botrytis cinerea* by *Gliocladium roseum* in raspberry. *Canadian Journal of Plant Pathology* 20, 243-52.

Yourman, L.F., Jeffers, S.N., 1999. Resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in greenhouse isolates of *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 83, 569-75.

Tabela 1- Número médio de conidióforos de *Botrytis cinerea* (Bc) em folhas de morangueiro tratadas com isolados de *Clonostachys rosea* (Cr) e inoculadas com o patógeno em diferentes intervalos após a aplicação do antagonista.

Isolado	Intervalo (h) de inoculação de Bc após aplicação de Cr						
	0	24	48	72	120	168	288
PRIMEIRA EXECUÇÃO DO EXPERIMENTO							
NCR61/F	7,8 c**	62,9b	24,3bc	32,7bc	42,8c	72,9bc	46,7b
Pg 88-710	12,6c	48,9bc	30,0bc	27,7bc	77,5b	19,5bc	34,7b
NCR62/F	16,0c	50,3b	63,2b	40,1b	26,8c	88,3b	39,7b
NCR19/F	20,9c	11,2c	17,7c	10,1c	9,0d	12,3c	34,3b
NCR60/F	56,9 b	60,6b	19,0c	22,3bc	22,2cd	38,9bc	43,6ab
Testemunha*	250,0 a	275,2a	220,8a	239,3a	128,2a	220,5a	119,0a
SEGUNDA EXECUÇÃO DO EXPERIMENTO							
NCR61/F	8,3c	12,3cd	26,8c	19,3c	17,9c	18,7c	43,0c
Pg 88-710	11,2c	6,5d	65,9bc	13,0c	18,0c	33,4bc	16,5c
NCR19/F	15,7c	33,0c	109,5b	9,5c	61,0b	111,4b	50,1c
NCR60/F	21,0bc	86,5b	79,0bc	22,8c	11,9c	30,3bc	22,2c
NCR62/F	57,5b	86,7b	93,8b	112,8b	23,2bc	94,9bc	118,5b
Testemunha*	321,3a	204,6a	256,7a	234,7a	239,4a	264,4a	207,8a

* Aplicação de água destilada esterilizada

**Em cada coluna, as médias seguidas pela mesma letra não diferem (LSD, $\alpha=0,05$)

Tabela 2- Número médio de conidióforos de *Botrytis cinerea* (Bc) em folhas de morangueiro inoculadas com o patógeno e tratadas com isolados de *Clonostahys rosea* (Cr) em diferentes intervalos após a inoculação do patógeno.

Isolado	Intervalo (h) de aplicação de Cr após a inoculação de Bc						
	0	24	48	72	120	168	288
PRIMEIRA EXECUÇÃO DO EXPERIMENTO							
Pg 88-710	0,7b**	0,7c	0,0b	4,0b	0,4b	1,1b	1,0b
NCR61/F	1,4b	2,0c	0,7b	0,4b	1,5b	1,8b	4,7b
NCR60/F	3,6b	4,1c	1,1b	2,9b	0,8b	1,1b	1,6b
NCR19/F	7,1b	1,7c	0,1b	5,2b	0,6b	2,8b	1,8b
NCR62/F	12,3b	16,6b	0,0b	1,7b	8,7b	3,4b	5,7b
Testemunha*	127,9a	58,7a	100,9a	177,2a	193,4a	171,9a	100,3a
SEGUNDA EXECUÇÃO DO EXPERIMENTO							
Pg 88-710	4,10c	18,7b	10,7b	21,0b	1,9b	1,5b	1,0b
NCR61/F	11,8c	10,3bc	21,2b	6,30bcd	8,6b	1,5b	4,4b
NCR60/F	13,5c	2,50 c	7,60b	5,40cd	1,3b	0,6b	4,5b
NCR19/F	15,4c	20,6b	5,40b	1,00 d	1,6b	6,6b	2,9b
NCR62/F	55,1b	14,6bc	23,8b	21,8bc	2,1b	5,4b	7,7b
Testemunha*	256,9a	242,5a	234,3a	151,9a	130,7a	178,4a	136,9a

* Aplicação de água destilada esterilizada

**Em cada coluna, as médias seguidas pela mesma letra não diferem (LSD, $\alpha=0,05$)

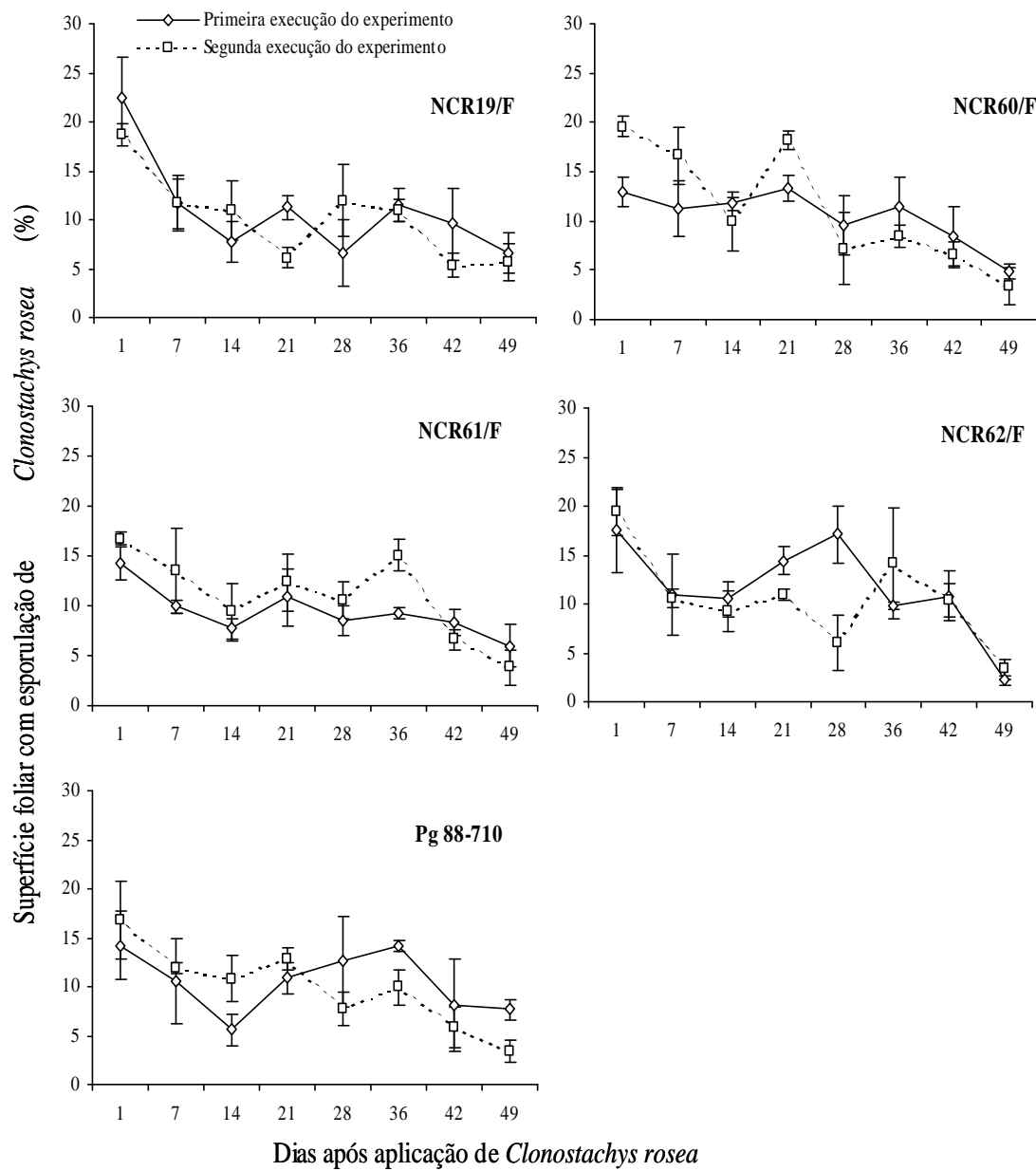


Figura 1- Superfície com esporulação de *Clonostachys rosea* em folhas de morangueiro amostradas após 1, 7, 14, 21, 28, 36, 42 e 49 dias da aplicação do antagonista. Barras verticais representam o erro padrão da média.

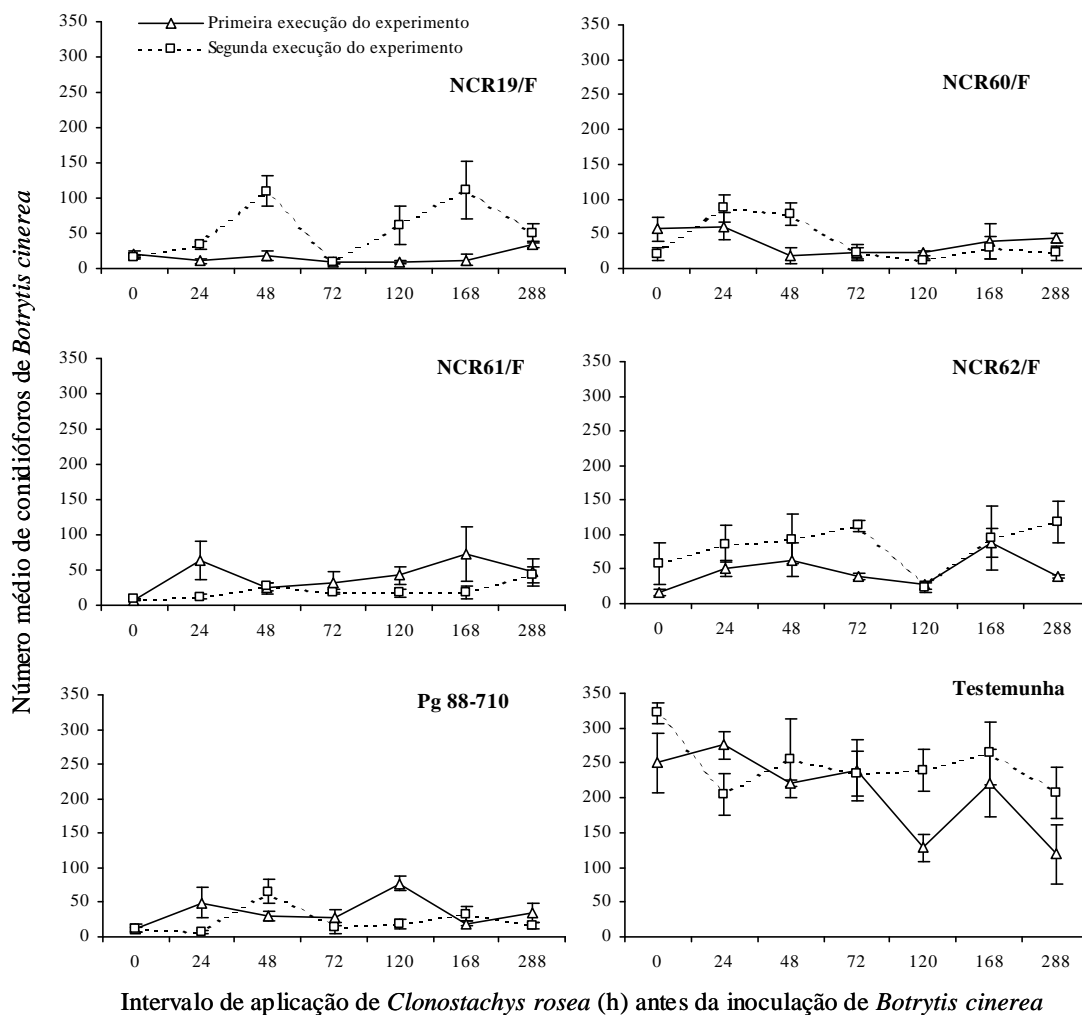


Figura 2 Intensidade de colonização foliar por *Botrytis cinerea* e isolados *Clonostachys rosea*. Plantas de morangueiro foram atomizadas com suspensão de conídios de *C.rosea* ou água destilada esterilizada (testemunha) e após 1, 7, 14, 21, 28, 36, 42 e 49 dias, foram amostrados dois folíolos de cada repetição, os quais foram inoculados com patógeno e mantidos em câmara úmida. Após 24h, confeccionaram-se discos dos folíolos os quais foram plaqueados em meio PCA e após 12 dias a colonização dos tecidos pelo patógeno e antagonista foi quantificada.

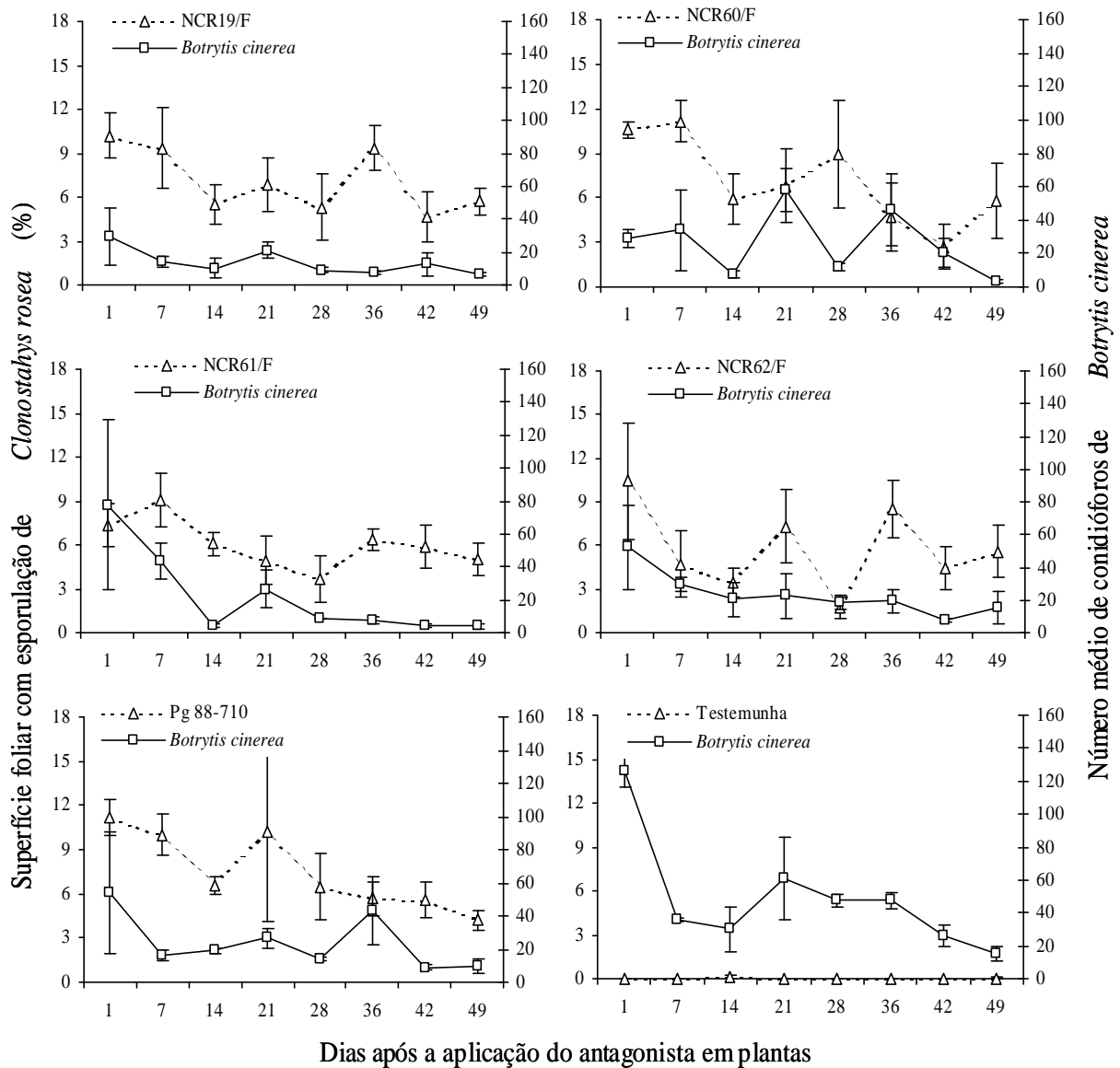


Figura 3- Intensidade de colonização foliar por *Botrytis cinerea* e isolados *Clonostachys rosea*. Plantas de morangueiro foram atomizadas com suspensão de conídios de *C. rosea* ou água destilada esterilizada (testemunha) e após 1, 7, 14, 21, 28, 36, 42 e 49 dias, foram amostrados dois folíolos de cada repetição, os quais foram inoculados com patógeno e permaneceram em câmara úmida. Após 24h, confeccionaram-se discos dos folíolos os quais foram plaqueados em meio PCA e após 12 dias a colonização dos tecidos pelo patógeno e antagonista foi quantificada. Segunda execução do experimento. Linhas verticais representam o erro padrão da

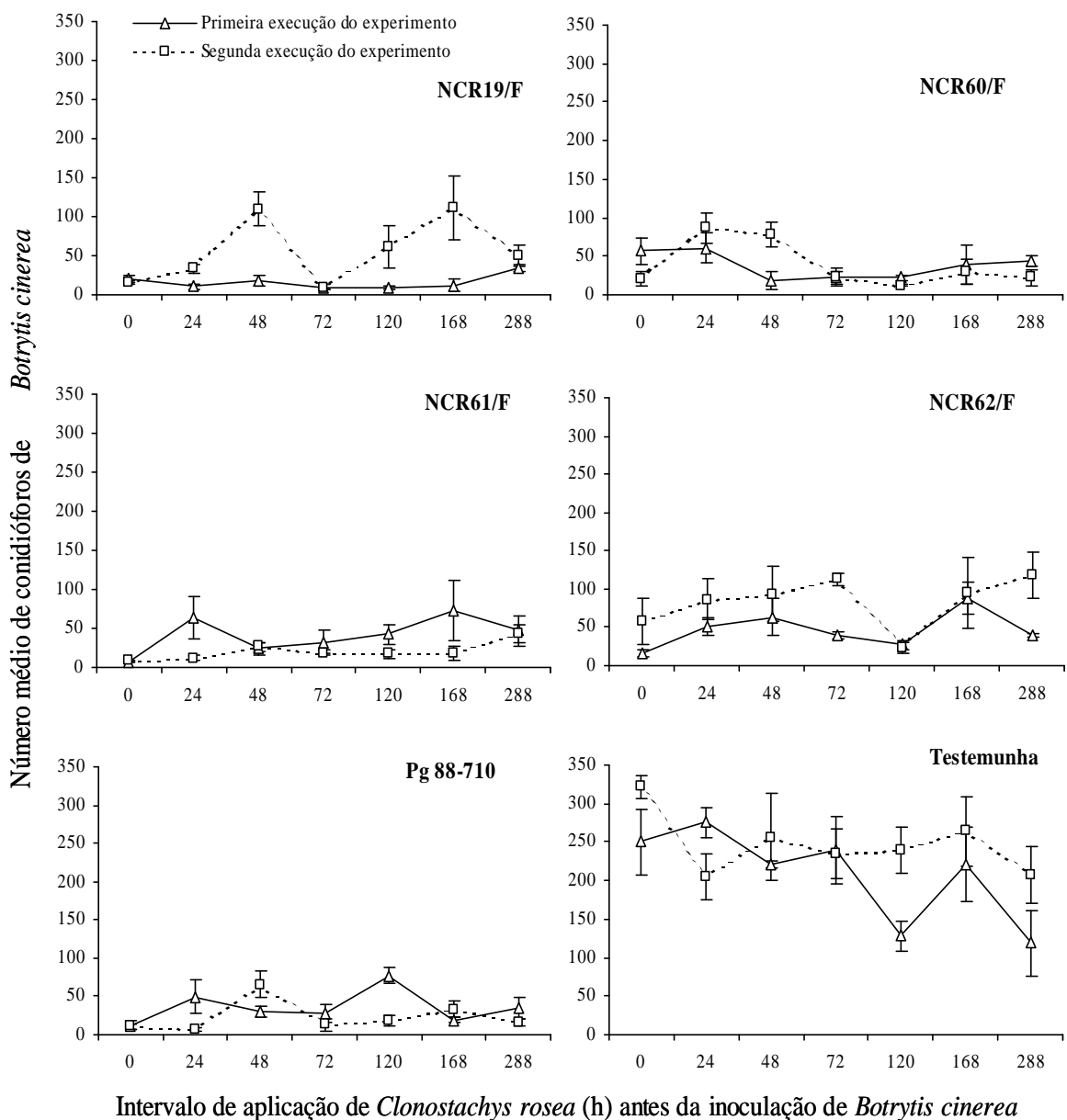


Figura 4 Número médio de conidióforos de *Botrytis cinerea* em folhas de morangueiro tratadas com isolados de *Clonostachys rosea* ou água destilada esterilizada (testemunha) e inoculadas com o patógeno em diferentes intervalos após a aplicação do antagonista. Linhas verticais representam o erro padrão da média.

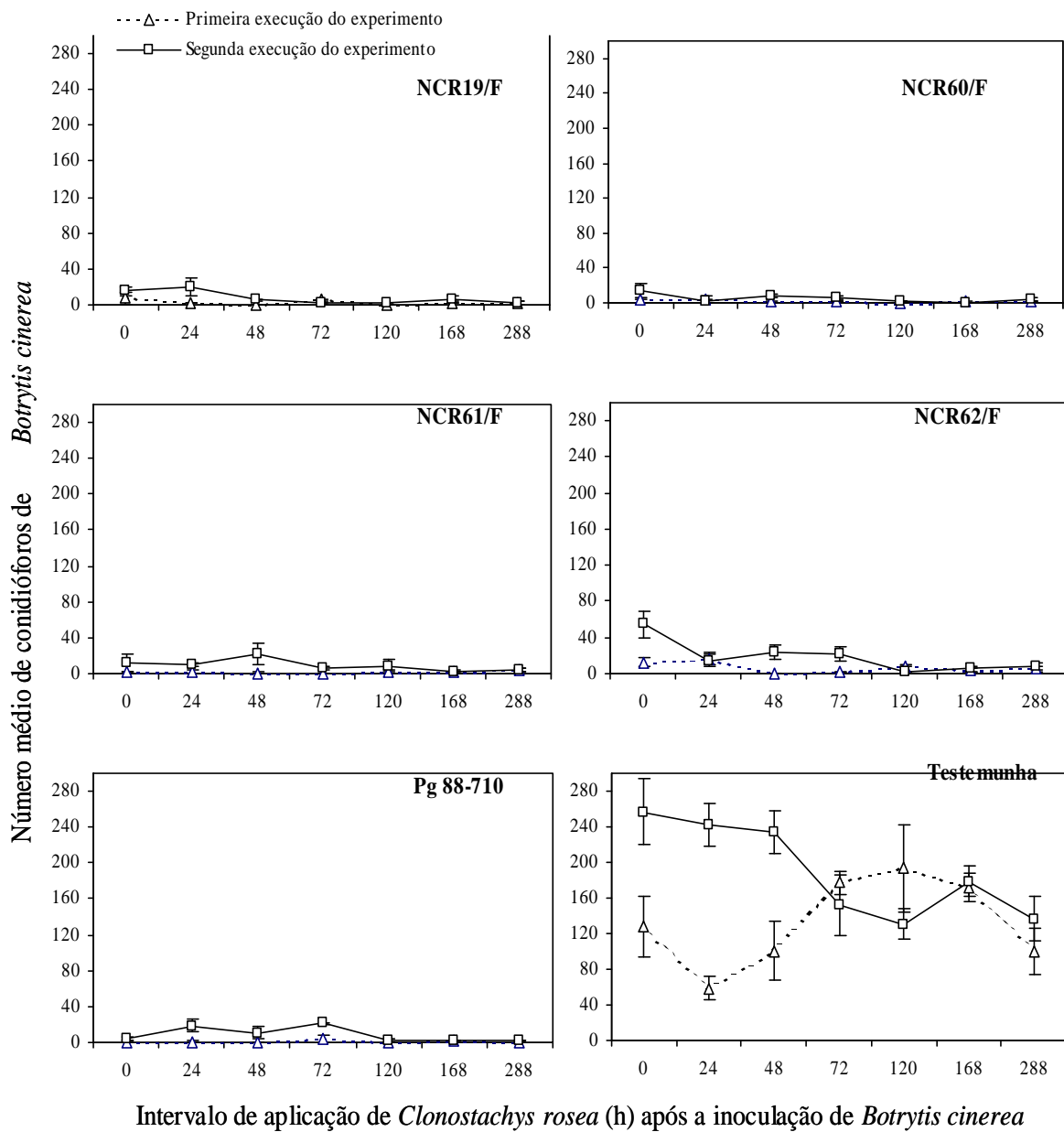


Figura 5 Número médio de conidióforos de *Botrytis cinerea* em folhas de morangueiro inoculadas com o patógeno e tratadas com isolados de *Clonostachys rosea* ou água destilada esterilizada em diferentes intervalos após a inoculação do patógeno. Linhas verticais representam o erro padrão da média.

Conclusões Gerais

Com base nas hipóteses iniciais e resultados obtidos no presente trabalho, concluiu-se que:

.Os quatros isolados brasileiros de *C. rosea* são tão ou mais eficiente que o isolado Pg 88-710 na colonização foliar, assim como no antagonismo a *B. cinerea* ;

.Períodos prolongados de alta umidade relativa ou ausência de molhamento foliar, não influenciou de forma significativa a colonização foliar por *C. rosea*, assim com a supressão da esporulação de *B. cinerea* pelo antagonista;

.A temperatura ótima para crescimento micelial e colonização foliar por *C. rosea* é, aproximadamente, 25°C;

.A 10°C, *C. rosea* não foi capaz de competir com *B. cinerea*;

.*Clonostachys rosea* foi eficiente em reduzir a esporulação de *B. cinerea* em intervalos de aplicação de até 280h, porém foi mais efetivo em competir quando aplicado após o patógeno;

.*C. rosea* sobreviveu em folhas verdes de morangueiro, e a colonização foliar pelo antagonista decresceu com o tempo.