

ÁLEFE VITORINO BORGES

**INTERAÇÃO *Clonostachys rosea* - *Botrytis cinerea* EM MORANGUEIROS
E MUDANÇAS METABÓLICAS NAS PLANTAS**

Dissertação 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
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

B732i
2016
Borges, Álefe Vitorino, 1989-
Interação *Clonostachys rosea* - *Botrytis cinerea* em
morangueiros e mudanças metabólicas nas plantas / Álefe
Vitorino Borges. – Viçosa, MG, 2016.
vii, 29f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Luiz Antonio Maffia.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 26-29.

1. Mofo cinzento - Controle biológico. 2. Antagonistas
fúngicos. 3. *Botrytis cinerea*. 4. *Clonostachys rosea*. 5. Plantas
- Metabolismo. 6. Análise foliar. 7. Morango - Doenças e
pragas. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Fitopatologia. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia.
II. Título.

CDD 22. ed. 632.4

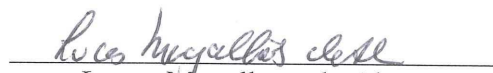
ÁLEFE VITORINO BORGES


**INTERAÇÃO *Clonostachys rosea* - *Botrytis cinerea* EM MORANGUEIROS
E MUDANÇAS METABÓLICAS NAS PLANTAS**

Dissertação 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: 24 de fevereiro de 2016.


Wagner Luiz Araújo


Lucas Magalhães de Abreu


Luiz Antonio Maffia
(Orientador)

Aos meus avós, José Borges e Eliza.

Aos meus pais, David e Zilene.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tantas bênçãos concedidas e por toda força ao longo da caminhada;

À minha querida EAFA – ES, atual IFES Campus - Alegre, onde tudo começou e onde meus olhos se abriram para sonhos maiores;

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do curso de graduação e mestrado;

Ao Prof. Luiz A. Maffia, pela orientação, amizade e confiança;

Ao Prof. Wagner L. Araújo, pelo suporte profissional durante a realização deste trabalho;

Aos demais professores do departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos durante o curso;

Ao Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol), em especial à Nívea Vieira, pelo apoio e parceria nos trabalhos;

Aos parceiros e produtores José Wanderlei e Adilson, pela confiança da realização deste trabalho em suas propriedades;

Aos amigos do laboratório de Controle Biológico pelo auxílio no trabalho e momentos de convivência repletos de descontração;

Aos amigos Luis Carlos (Guatemala), Josimar, Lucas e, em especial, Rodrigo pela amizade sincera e apoio durante essa jornada;

À minha família, pelo carinho e amor, especialmente minha mãe, Zilene, a qual jamais mediu esforços para auxiliar em minhas realizações;

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

BIOGRAFIA

Álefe Vitorino Borges, filho de David Hubner de Freitas e Zilene Vitorino Costa, nasceu em 15 de maio de 1989, em Mutum, Estado de Minas Gerais.

Em 2006, ingressou no curso Técnico em Agropecuária da Escola Agrotécnica Federal de Alegre (EAFA - ES), atual IFES – Campus Alegre, onde também concluiu o ensino médio em 2008.

Em 2009, se tornou aluno no curso de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa (MG), onde graduou-se em março de 2014 e iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia na mesma universidade.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Dinâmica populacional na interação patógeno-antagonista	3
2.2. Perfil metabólico no estudo da interação planta-microrganismo	5
3. MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1. Experimento em câmara de crescimento	9
3.1.1. Colonização foliar por <i>Clonostachys rosea</i> e <i>Botrytis cinerea</i>	10
3.1.2. Sobrevivência epifítica de <i>Clonostachys rosea</i>	11
3.2. Experimentos em campos comerciais	11
3.3. Análise dos dados	14
4. RESULTADOS	15
4.1. Experimento em câmara de crescimento	15
4.1.1. Colonização foliar por <i>Clonostachys rosea</i> e <i>Botrytis cinerea</i>	15
4.1.2. Sobrevivência epifítica de <i>Clonostachys rosea</i>	16
4.2. Experimentos em campos comerciais	17
4.2.1. Colonização foliar por <i>Clonostachys rosea</i> e <i>Botrytis cinerea</i>	17
4.2.2. Sobrevivência epifítica de <i>Clonostachys rosea</i>	19
4.2.3. Perfil metabólico de morangueiros	19
6. CONCLUSÕES	25
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

RESUMO

BORGES, Álefe Vitorino, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2016. **Interação *Clonostachys rosea* - *Botrytis cinerea* em morangueiros e mudanças metabólicas nas plantas.** Orientador: Luiz Antonio Maffia.

Botrytis cinerea, o agente etiológico do mofo cinzento, é um patógeno importante em morangueiros. *Clonostachys rosea* é efetivo no biocontrole dessa doença em diversas culturas, em condições controladas e de campo. O antagonista pode, ainda, promover o crescimento, aumentar a produção e induzir respostas de defesa nas plantas. Objetivando-se investigar os efeitos da aplicação do antagonista na população do patógeno e no metabolismo da planta, estudou-se a interação entre *C. rosea*, *B. cinerea* e morangueiros com base na dinâmica populacional dos fungos e no perfil metabólico do hospedeiro. Avaliou-se a colonização foliar de ambos os fungos e a sobrevivência epifítica de *C. rosea* em folhas, em câmara de crescimento e em cultivos comerciais. O antagonista se estabeleceu e reduziu a colonização por *B. cinerea*, principalmente quando aplicado semanalmente. A população de *C. rosea* diminuiu com o tempo após a aplicação, e a intensidade de colonização pelo patógeno foi inversamente proporcional à do antagonista. Em câmara de crescimento, a população epifítica do antagonista reduziu-se substancialmente aos 3 dias da aplicação. Em condições de campo, onde o intervalo mínimo entre a última aplicação e coleta de folhas foi de 7 dias, não foi possível quantificar a população epifítica do antagonista. Comparou-se o perfil metabólico de morangueiros tratados com *C. rosea* em intervalos de 7, 14 ou 28 dias ao de morangueiros não tratados, e verificou-se que a aplicação semanal alterou o perfil metabólico. Aumentos significativos nos níveis de citrato e succinato, compostos intermediários do ciclo de Krebs, de alguns fitoesteróis, fitoestrogênios, cafeína e piceatanol foram observados. Tais alterações podem estar relacionadas à promoção de crescimento e ativação do sistema de defesa. Concluiu-se que *C. rosea* afetou a dinâmica populacional de *B. cinerea* em tecidos assintomáticos e alterou o perfil metabólico de morangueiros. Esses resultados subsidiam estudos subsequentes para elucidar o modo de ação de agentes de biocontrole.

ABSTRACT

BORGES, Álefe Vitorino, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2016. ***Clonostachys rosea* - *Botrytis cinerea* interaction in strawberry plants and metabolic changes in the plants.** Adviser: Luiz Antonio Maffia.

Botrytis cinerea, the causal agent of gray mold, is an important pathogen of strawberry plants. *Clonostachys rosea* is effective in the biocontrol of gray mold in several crops, in growth chamber or field conditions. The antagonist may also promote growth, increase the production and induce defense responses of plants. Aiming to investigate the effects of antagonist application on pathogen population and plant metabolism, we studied the interaction of *C. rosea*, *B. cinerea* and strawberry plants based on the population dynamics of both fungi and metabolic profile of the host. We assessed leaf colonization of both fungi and the epiphytic survival of *C. rosea* on leaves, under growth chamber and in commercial cultivations. The antagonist established in leaves and reduced the colonization by *B. cinerea*, mainly when applied weekly. The population of *C. rosea* decreased over time after the application and tissue colonization by the pathogen was inversely proportional to the colonization by the antagonist. Under growth chamber the antagonist population was substantially reduced 3 days after applied. Under field conditions, which the minimal interval between last application and the collection of leaves was 7 days, it was not possible to quantify the epiphytic population of the antagonist. We compared the metabolic profiles of strawberry plants treated with *C. rosea* at intervals of 7, 14, or 28 days with the profiles of untreated plants, and found that weekly applications altered the metabolic profiles. There was a significant increase in the levels of citrate and succinate, intermediate compounds in the Krebs cycle, some phytosterols, phytoestrogens, caffeine, and piceatannol. These changes may be related to growth promotion and activation of plant defense system. In conclusion, *C. rosea* affected the population dynamics of *B. cinerea* in symptomless tissues and changed the metabolic profile of strawberry plants. These results can support subsequent studies aiming to elucidate the action mode of biocontrol agents.

1. INTRODUÇÃO

Botrytis cinerea, agente etiológico do mofo cinzento, pode infectar mais de 200 espécies vegetais (Williamson et al., 2007), incluindo aquelas de importância econômica como o morangueiro, na qual pode causar severas perdas em quantidade e qualidade de frutos. O fungo infecta os tecidos e pode permanecer latente até que as condições se tornem favoráveis à colonização e ao progresso da doença. O patógeno é necrotrófico, altamente agressivo e variável geneticamente (Williamson et al., 2007), sendo, portanto, de controle difícil e dispendioso. Apesar do uso de fungicidas ser a principal forma de manejo do mofo cinzento, a eficácia do controle químico vem diminuindo em decorrência da seleção de populações resistentes (Kretschmer et al., 2009; Sutton et al., 1997). Assim, alternativas de manejo da doença, como o biocontrole, capazes de complementar ou substituir o controle químico são necessárias.

Dentre os agentes de biocontrole do mofo cinzento, destaca-se o fungo *Clonostachys rosea*. Resultados satisfatórios de controle do mofo cinzento foram obtidos com o uso de *C. rosea* em diversas culturas, em condições controladas e campo, nas quais o antagonista foi eficiente em proteger tecidos de infecção e em suprimir o patógeno em restos de cultura (Borges et al., 2015; Sutton et al., 2015; Chatterton and Punja, 2012; Silvera-Pérez et al., 2010; Cota et al., 2009; Cota et al., 2008b; Nobre et al., 2005; Morandi et al., 2003). *Clonostachys rosea* tem diferentes mecanismos de antagonismo, como a competição por espaço e nutrientes, hiperparasitismo, antibiose e indução de resistência (Lahlali and Peng, 2014; Sutton et al., 1997). Em adição, o fungo pode, também, promover o crescimento e aumentar a

produção de plantas (Sutton et al., 2015; Cota et al., 2009; Ravnskov et al., 2006; Johansen et al., 2005).

A aplicação semanal de *C. rosea* reduziu a incidência do mofo cinzento em flores e frutos e aumentou a produção de morangueiros (Cota et al., 2009). Tais resultados, possivelmente, não se devem apenas ao efeito direto do antagonista sobre o patógeno. Em um estudo de interação de *C. rosea* e *B. cinerea* em tomateiro, o antagonista estabeleceu-se no tecido vegetal, incluindo espaços intercelulares, e inibiu a colonização do patógeno (Saraiva et al., 2014). Em vista da capacidade endofítica de *C. rosea*, relação íntima antagonista-planta é estabelecida, o que sugere possíveis alterações metabólicas na planta que podem contribuir para a indução de resistência bem como para a promoção de crescimento e produção.

Dentre as metodologias disponíveis para investigar mudanças no metabolismo, destaca-se o perfil metabólico, técnica que permite estudo parcial do metaboloma, capaz de detectar, quantificar e identificar os metabólitos presentes em determinada amostra (Allwood et al., 2008). O perfil metabólico tem sido usado para caracterizar as mudanças no metabolismo decorrentes da interação planta-patógeno (Aliferis et al., 2014), sendo possível detectar mudanças bioquímicas ligadas a respostas fenotípicas, mesmo antes que estas sejam visualmente evidentes (Jones et al., 2011). Ademais, alterações metabólicas resultantes da interação *C. rosea*-planta podem ser investigadas estabelecendo relações com o grau de colonização dos tecidos. Coletivamente, tais informações podem ajudar na compreensão de fenótipos relacionados à promoção de crescimento, produtividade e sanidade da planta.

Portanto, a fim de gerar conhecimento sobre os efeitos da aplicação de *C. rosea* sobre *B. cinerea* e o metabolismo da planta, podemos quantificar as populações do patógeno e do antagonista bem como estudar as alterações metabólicas que

ocorrem em tecidos colonizados por *C. rosea* e/ou *B. cinerea*. Nesse contexto, objetivou-se estudar a dinâmica populacional do patógeno e do antagonista em tecidos foliares de morangueiro e avaliar o perfil metabólico do hospedeiro, colonizado ou não pelos dois fungos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Dinâmica populacional na interação patógeno-antagonista

Estudos da dinâmica populacional de microrganismos habitantes de plantas, sejam fitopatogênicos ou não, são importantes para compreender a ecologia dos microrganismos, as inter-relações existentes e os fatores que afetam o crescimento e/ou estabelecimento da população. De fato, a dinâmica populacional de um microrganismo colonizando folhas depende de fatores ambientais, do estado fisiológico do tecido e da competição com microrganismos residentes (Morandi et al., 2001) ou agentes de biocontrole introduzidos. Assim, metodologias que permitam quantificar a população microbiana podem auxiliar na tomada de decisão de manejo de doenças bem como na avaliação de medidas de controle (Diguta et al., 2010), além de possibilitar o monitoramento da população de agentes de biocontrole.

Para avaliar a eficácia de agentes para biocontrole do mofo cinzento, alguns autores avaliam o potencial de esporulação dos fungos sobre tecidos destacados (Cota et al., 2009; Cota et al., 2008b; Nobre et al., 2005; Sutton and Peng, 1993; Peng and Sutton, 1991). Estimar a porcentagem de área foliar com esporulação pode ser uma forma indireta de quantificar a colonização foliar (Peng and Sutton, 1991) e, portanto, fazer inferências sobre a população do microrganismo no tecido vegetal. Ademais, dentre os métodos para estimar a população microbiana, incluem-se técnicas de diluição seriada, com alíquotas semeadas em meios seletivos ou não, e aqueles baseados em PCR.

A sobrevivência de *C. rosea* f. *catenulata* e de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* sobre raízes de pepineiros (*Cucumis sativus* L.), foi avaliada por meio de diluições seriadas (Chatterton et al., 2008). Os autores aplicaram o antagonista sobre sementes, na concentração de 1×10^7 conídios.mL⁻¹, o qual persistiu por até 60 dias em níveis próximos a 1×10^5 UFC/g de matéria fresca de raízes, e reduziu significativamente a população do patógeno. Em contrapartida, a densidade populacional do antagonista foi menor sobre folhas de gerânio que sobre raízes de pepineiros e foi afetada pelas flutuações nas condições ambientais (Chatterton and Punja, 2012). O rápido decréscimo populacional (cerca de 50 %) também foi observado até 10 dias após a aplicação também ocorreu com *Ulocladium atrum*, aplicado sobre folhas de ciclame (*Cyclamen persicum* L.) para biocontrole do mofo cinzento, causado por *B. cinerea*. Posteriormente, a população do antagonista se manteve estável por 60 dias (Köhl et al., 2000). Também por meio de diluições seriadas, a dinâmica populacional de patógenos da parte aérea pode ser investigada. Para a bactéria *Xanthomonas fragariae*, agente causal da mancha angular em folhas de morangueiro, houve uma diminuição da ordem de 1000 vezes aos 3 dias após a inoculação, seguido de uma população estável até os 14 dias e aumento significativo após surgirem os primeiros sintomas (Kastelein et al., 2014).

O desenvolvimento de técnicas baseadas em reação em cadeia da polimerase (PCR), com destaque para a PCR quantitativa em tempo real (qPCR), contribuiu para estimar de maneira mais sensível a população de microrganismos, sendo possível detectar DNA/RNA mesmo em baixas concentrações. A sensibilidade e reprodutibilidade da qPCR são maiores que da PCR convencional, além de a qPCR ser mais rápida e ter menor risco de contaminação (Zhang and Fang, 2006). Com um método baseado em qPCR para monitorar infecções naturais e quiescentes de *B.*

cinerea em frutos de 32 genótipos de videira (*Vitis* spp.), identificou-se a variação entre os genótipos quanto à resistência à infecção, grau de colonização e severidade do mofo cinzento, o que foi útil para monitorar a colonização e auxiliar na tomada de decisão no manejo da doença (Cadle-Davidson, 2008). Primers específicos para um fragmento da região intergênica (IGS) de DNA ribossomal nuclear de *B. cinerea*, previamente descrita por Suarez (2005), foram usados para quantificar o patógeno e avaliar diferentes estratégias de controle do mofo cinzento (Diguta et al. 2010). A técnica possibilita monitorar infecções do patógeno e avaliar estratégias de manejo do mofo cinzento. Com esse intuito, Palazzini et al. (2013) avaliaram o potencial de dois isolados de *C. rosea* em reduzir as populações de *Fusarium* spp. em experimentos de campo. *Fusarium* spp. sobrevivendo em caules de plantas de trigo foram quantificadas por meio de qPCR, o que permitiu observar que um dos isolados de *C. rosea* foi capaz de reduzir as populações dos patógenos.

Na cultura do morangueiro, já foram usados métodos baseados em PCR para detectar e/ou quantificar patógenos importantes, incluindo *B. cinerea* (Mirmajlessi et al., 2015), no entanto, não encontramos trabalhos em que a metodologia foi adotada visando monitorar a população de *B. cinerea* e avaliar tratamentos com agentes de biocontrole.

2.2. Perfil metabólico no estudo da interação planta-microrganismo

Microrganismos podem desempenhar importantes funções relacionadas ao crescimento e sanidade das plantas com as quais se associam. No estabelecimento de interações planta-microrganismo, há diferentes mecanismos envolvidos, sendo imprescindível a capacidade de colonização (Lugtenberg et al., 2002). Para tanto, inicia-se um processo de comunicação, a partir da produção de sinais de reconhecimento, dando início à colonização, o que garante o sucesso da interação

(Bais et al., 2006). Estes mecanismos são, sobretudo, estudados na interação planta-patógeno, visando elucidar modos de ação e respostas de defesa da planta. Uma das formas de se investigar as respostas em nível molecular é o uso de técnicas que permitem estudar parcialmente o metaboloma, como o perfil metabólico, sendo possível detectar e quantificar alterações nos níveis de metabólitos resultantes da interação. Nesses estudos, é possível identificar mudanças bioquímicas diretamente ligadas a respostas fenotípicas, antes que as respostas tornem-se visualmente evidentes (Jones et al., 2011).

Em plantas de soja infectadas por *Rhizoctonia solani*, diversas alterações ocorreram no metabolismo primário e secundário, envolvendo principalmente compostos associados ao metabolismo de aminoácidos e carboidratos (Aliferis et al., 2014). Os autores ressaltam o desvio de produtos do metabolismo primário para a biossíntese de metabólitos secundários, o que possivelmente se relaciona à resposta de defesa da planta. Em tomateiros inoculados com *B. cinerea* e *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, também ocorreram mudanças significativas no metabolismo primário e secundário, dependentes do patógeno desafiante (Camañes et al., 2015), o que evidencia a especificidade da interação planta-patógeno. Ademais, um decréscimo rápido nos conteúdos de aminoácidos em plantas de girassol (*Helianthus annuus*) infectadas com *B. cinerea* foi observado, possivelmente em vista do consumo dos aminoácidos pelo fungo (Dulermo et al., 2009). Nesse caso, a concentração de glutamato foi reduzida em regiões não infectadas, em decorrência do transporte deste para regiões infectadas, fornecendo nitrogênio ao fungo e desacelerando o processo de morte celular vegetal. Em folhas de arroz (*Oryza sativa*) inoculadas com isolado compatível de *Magnaporthe grisea*, observou-se aumento significativo nos níveis de alanina em relação às folhas inoculadas com isolado incompatível (Jones et al., 2011).

O sucesso da penetração do patógeno pode estar associado a esse aumento nos níveis de alanina, aminoácido relacionado à morte programada de células, facilitando a invasão e colonização do tecido. Em folhas de milho (*Zea mays*), infectadas com *Ustilago maydis*, houve 20 vezes mais hexoses livres que em folhas não infectadas (Doehlemann et al., 2008). Nesse caso, as hexoses livres podem ser usadas pelo patógeno como uma fonte de carbono.

São escassos os estudos usando ferramentas de estudo do metaboloma para investigar a interação de plantas e organismos benéficos (Allwood et al., 2008), principalmente agentes de biocontrole. Grande parte dos antagonistas usados em estudos de biocontrole incluem espécies de *Trichoderma* e *Clonostachys*. Os modos de ação pelos quais isolados de *Trichoderma* spp. controlam patógenos na rizosfera têm sido muito mais estudados que aqueles associados a *C. rosea*. Espécies de ambos os gêneros têm quatro principais modos de ação: competição por espaço e/ou nutrientes, antibiose, hiperparasitismo e indução de resistência (Massart et al., 2015; Roberti et al., 2008; Sutton et al., 1997). Adicionalmente, essas espécies podem promover aumento no crescimento e na produção de plantas (Sutton et al., 2015; Cota et al., 2009; Roberti et al., 2008; Ravnskov et al., 2006; Johansen et al., 2005; Harman et al., 2004).

Trichoderma spp. podem ativar a expressão de elicitores relacionados ao sistema de defesa da planta, além de induzir mudanças metabólicas que resultam em maior resistência a patógenos (Harman et al., 2004). Mudanças significativas nos níveis de aminoácidos, açúcares, poliaminas e intermediários do ciclo do ácido cítrico foram observadas em raízes de *Arabidopsis thaliana* colonizadas por *T. asperelloides* T203 (Brotman et al., 2012). As alterações mediadas pelo fungo podem resultar em aumento da oferta de energia necessária para ativar o sistema de defesa da planta e

promover o crescimento. Não obstante, metabólitos secundários produzidos por *T. asperelloides* podem estar associados a essas respostas (Vinale et al., 2008).

O fungo *Clonostachys rosea* é amplamente estudado como antagonista a fitopatógenos, principalmente a *B. cinerea*, com eficiência comprovada em condições controladas e campo (Borges et al., 2015; Sutton et al., 2015; Chatterton and Punja, 2012; Cota et al., 2009; Cota et al., 2008b; Nobre et al., 2005; Morandi et al., 2003). Ademais, já se obtiveram resultados expressivos na promoção de crescimento e aumento da produção. A produção de plantas de mirtilo (*Vaccinium corymbosum* L.), cultivadas comercialmente, aumentou com aplicação de *C. rosea* (Sutton et al., 2015). Os autores observaram que, com a aplicação, a proporção de bagas de alta qualidade na colheita dobrou. Também houve aumento de produção superior a 75%, em relação à testemunha, com a aplicação semanal de *C. rosea* sobre morangueiros e, além disso, reduziu-se a incidência do mofo cinzento em flores e frutos (Cota et al., 2009).

A promoção de crescimento pode estar associada à capacidade do organismo de inativar compostos tóxicos presentes na rizosfera, aumentar a absorção de nutrientes e eficiência de uso de nitrogênio, além da possibilidade de poder solubilizar nutrientes no solo. Adicionalmente, *C. rosea* pode induzir alterações moleculares ligadas à resposta de defesa da planta (Roberti et al., 2008) e promoção de crescimento. No entanto estas mudanças não foram ainda descritas na interação *C. rosea*-planta-patógeno.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Conduziram-se experimentos em condições controladas, na Unidade de Controle Biológico do Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, e em condições de inoculação natural em cultivos comerciais de morangueiro em Coimbra – MG e Ervália – MG.

Em ambas as condições, usou-se o isolado NCR61/F de *C. rosea* (Nobre et al., 2005). Sacos plásticos contendo 150 g de arroz e 90 mL de água destilada, autoclavados por 20 min a 121 °C, foram adicionados de 5 mL de suspensão de 10^6 conídios.mL⁻¹ e incubados a 25 °C e fotoperíodo de 12 h. A cada 2 dias o substrato foi revolvido, durante 8-10 dias. Por meio de amostragem de grãos colonizados e posterior lavagem com água (1 g de arroz colonizado em 10 mL de água), estimou-se a concentração de conídios com auxílio de câmara de Neubauer para obter suspensão com 10^6 conídios.mL⁻¹, usada em todos os experimentos.

Para o experimento em câmara de crescimento (3.1), inoculou-se um isolado de *B. cinerea* (BcMo) obtido de folhas de morangueiro coletadas em Coimbra. O isolado foi cultivado em meio de batata-dextrose-ágar (BDA) a 21 °C, fotoperíodo de 12h, e após 10 dias, preparou-se uma suspensão com 10^5 conídios.mL⁻¹. Inoculações nos experimentos de campo (3.2) foram naturais.

3.1. Experimento em câmara de crescimento

Morangueiros ‘Camarosa’ foram cultivados em vasos de 2 L contendo substrato Tropstrato®, até atingirem seis folhas totalmente expandidas. Periodicamente, removeram-se as folhas senescentes e as flores, para obter plantas em condições similares para a razão fonte-dreno. Adubaram-se as plantas a cada 15 dias, com solução nutritiva contendo 15 g de formulado N-P-K (20-20-20) por litro (75 mL.vaso⁻¹).

Adotaram-se sete tratamentos: 1. aplicação de *C. rosea* 24 h antes da inoculação de *B. cinerea* (Cr+Bc); 2. aplicação de *C. rosea* 24 h após a inoculação (Bc+Cr); 3. aplicação de *C. rosea* simultaneamente à inoculação e aplicação de água 24 h após (Bc/Cr); 4. inoculação 24 h antes da aplicação de água (Bc+Água); 5. inoculação 24 h após a aplicação de água (Água+Bc); 6. aplicação de *C. rosea* 24 h

após a aplicação de água (Água+Cr); 7. duas aplicações de água espaçadas de 24 h (Água+Água). Com auxílio de atomizador tipo DeVilbiss, aplicaram-se os tratamentos até o ponto de escorrimento nas plantas, as quais foram mantidas em câmara de crescimento a 22 °C com umidade relativa superior a 75 % durante todo o período experimental.

Avaliaram-se a colonização foliar por *C. rosea* e *B. cinerea* e a sobrevivência epifítica de *C. rosea* em experimento executado por duas vezes, cada uma em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições (uma planta = uma unidade experimental).

3.1.1. Colonização foliar por *Clonostachys rosea* e *Botrytis cinerea*

Após 12 dias das pulverizações dos tratamentos descritos em 3.1, avaliou-se a colonização foliar de ambos os fungos. De cada unidade experimental, foram coletados três folíolos, dos quais obtiveram-se 10 discos de 1 cm de diâmetro, que foram depositados em meio paraquat cloranfenicol ágar (PCA) (Peng and Sutton, 1991) em placas de Petri (90 mm). As placas foram mantidas a 22 °C, 12h de fotoperíodo, e avaliadas após 10-12 dias. A avaliação da colonização do tecido foi realizada com o auxílio de escalas diagramáticas para porcentagem de área do disco foliar com esporulação de *C. rosea* (AFC) e número médio de conidióforos de *B. cinerea* (NMC). Sob microscópio estereoscópico, estimou-se a AFC em cada disco foliar a partir de 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 com *C. rosea* (Nobre et al., 2005). Para o NMC, usou-se a seguinte 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 (Peng and Sutton, 1991). Para as análises estatísticas, usou-se o valor intermediário

compreendido entre o limite inferior e superior de cada nota. Os dados de cada unidade experimental foram representados pela média dos dez discos foliares.

3.1.2. Sobrevivência epifítica de *Clonostachys rosea*

Estudou-se a sobrevivência epifítica do antagonista em folhas dos tratamentos T6 e T7 descritos em 3.1. A metodologia baseou-se em Freeman et al. (2004), com modificações. De cada unidade experimental, aos 0, 3, 6, 9 e 12 dias após a aplicação de *C. rosea* ou água (testemunha), um folíolo foi coletado, o qual foi imerso em 25 mL de água destilada esterilizada (ADE) em tubos Falcon, seguindo-se de agitação por 2 min em vortex. Alíquotas de 200 µL, tomadas diretamente da solução de lavagem ou de diluições seriadas (10^{-1} e 10^{-2}) foram semeadas em meio seletivo para *C. rosea* (Park et al., 1992) com auxílio de alça de Drigalski. As placas foram mantidas a 25 °C, no escuro e, após 72 h, contou-se o número de colônias e se estimou o número de unidades formadoras de colônias por folíolo (UFC/folíolo).

3.2. Experimentos em campos comerciais

Como mencionado anteriormente, em Coimbra e Ervália ocorreu inoculação natural de *B. cinerea*. Adotaram-se quatro tratamentos, três com aplicação de *C. rosea* em intervalos de 7, 14 ou 28 dias, e um sem aplicação (testemunha), representados adiante como Cr7, Cr14, Cr28 e Test, respectivamente. As aplicações foram realizadas via pulverizador costal manual com bico de jato cônico cheio. Em Coimbra, as pulverizações foram em morangueiros ‘Camiño Real’, com 57 dias após o plantio em sistema convencional no solo e, em Ervália, em plantas de ‘Albion’ com cerca de um ano do plantio em sistema semi-hidropônico coberto.

Em cada local, executou-se um experimento em delineamento em blocos ao acaso (DBC), com sete repetições (18 plantas = uma unidade experimental). Efetuaram-se as mesmas avaliações e análises estatísticas descritas em 3.1. Em cada

unidade experimental, aos 27 dias do início das pulverizações, coletaram-se cinco folíolos para avaliar a colonização foliar de *C. rosea* e de *B. cinerea*, como em 3.1.1, e um folíolo para avaliar a sobrevivência epifítica de *C. rosea*, como descrito em 3.1.2.

Avaliou-se, também, o perfil metabólico de morangueiros do experimento em Coimbra. Cinco folíolos por unidade experimental foram coletados às 14 h do dia anterior à próxima aplicação de *C. rosea*, segundo os tratamentos, no intervalo de execução do experimento (28 dias). Logo, foram realizadas quatro coletas para Cr7 aos 6 dias após cada aplicação, duas coletas para Cr14 aos 13 dias após cada aplicação e uma coleta para Cr28 aos 27 dias após a aplicação do antagonista. Para o tratamento controle (Test) foram realizadas quatro coletas como feito para Cr7. Os folíolos foram acondicionados em sacos de papel alumínio e imediatamente transferidos para nitrogênio líquido, armazenando-se a -80 °C em ultra freezer até o processamento das amostras e análises (Ferne et al., 2011). A extração de metabólitos primários, derivatização da fase polar, adição de padrões e injeção em GC-MS basearam-se em Lisec et al. (2006), como descrito a seguir.

Amostras de 50 mg, previamente maceradas em nitrogênio líquido e acondicionadas em microtubos (2 mL), foram usadas para extração de metabólitos. Adicionaram-se 700 µL do extrator metanol PA (EMSURE®, Merck) e 30 µL de ribitol (0,2 mg.mL⁻¹ em água), padrão interno, agitando-se vigorosamente em vortex para inativação de enzimas. A extração ocorreu sob incubação a 70 °C por 15 min em Thermomixer Confort (Eppendorf®) a 950 rpm. Após centrifugação (11.000 g por 10 min), transferiram-se 600 µL do sobrenadante para novos tubos e adicionaram-se 375 µL de clorofórmio PA (CHCl₃) (EMSURE®, Merck) e 750 µL de água deionizada autoclavada. Procedeu-se agitação em vortex (15 s) seguida por centrifugação a 2.200 g por 15 min. A partir da fase polar, fase superior contendo os metabólitos, coletaram-

se alíquotas de 50 μL , que foram desidratadas em *speedVac* (Eppendorf®) sem aquecimento. Todas as amostras desidratadas foram armazenadas em ultra freezer a -80 °C.

Para a derivatização da fase polar, as amostras retiradas do ultra freezer foram novamente levadas ao *speedVac* por 15 min. Em seguida, adicionaram-se 40 μL de piridina 99,8 % (Sigma-Aldrich) contendo metoxiamina hidróclorido (Sigma-Aldrich) a 20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Um tubo com mesmo volume de metoxiamina hidróclorido foi usado como controle do procedimento. As amostras e controles foram mantidos por 2 h a 37 °C, sob agitação em thermomixer a 950 rpm. Em seguida, adicionaram-se 70 μL de uma solução contendo 1 mL de N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA) e 20 μL de uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) a fim de gerar índices de retenção (Lisec et al., 2006), mantendo-se os tubos por 30 min a 37 °C sob agitação em thermomixer a 950 rpm. Por fim, após testes de otimização do volume da alíquota para injeção (50 a 200 μL), 100 μL foram transferidos para frascos de vidro para injeção de amostras.

As amostras foram analisadas utilizando um sistema GC-MS TruTOF GC-TOFMS: GC Cromatógrafo Agilent, 7890A e Espectrômetro TruTOF® HT TOFMS, Leco, equipado com uma coluna capilar com 30 m (DB-35 MS, Agilent Technologies). O volume de injeção foi de 1 μl da amostra no modo splitless a 230 °C no injetor utilizando o gás hélio a 2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A rampa de temperatura iniciou a 80 °C e, em seguida, aumentou-se 15 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até alcançar 330 °C, sendo essa temperatura mantida durante 6 min. Cromatogramas tiveram a linha de base corrigida e sua deconvolução com o software ChromaTOF (LECO). Os picos foram atribuídos usando os espectros deconvoluídos obtidos utilizando o software TargetSearch (Cuadros-Inostroza et al., 2009) e biblioteca de massas espectrais de compostos

derivados de trimetilsilício (TMS) obtida do Instituto Max Planck de Fisiologia Molecular Vegetal (<http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de/csbdb>). Áreas de picos cromatográficos para íons fragmentados anteriormente foram verificadas e normalizadas pela área do pico correspondente ao ribitol e corrigidas pela massa da amostra extraída (Lisec et. al., 2006).

3.3. Análise dos dados

Verificou-se a homogeneidade de variâncias entre as execuções dos experimentos executados por duas vezes (teste de Levene, $\alpha = 0,05$). Após efetuar a análise de variância, submeteram-se os dados de colonização dos discos foliares ao teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Para os dados de frequências de colonização, efetuou-se análise não paramétrica (Bakeerathan and Samita, 2003) e comparações múltiplas com o teste de Fisher (LSD, $\alpha = 0,05$). Utilizou-se o coeficiente de correlação de Spearman (r_s) para estudar a correlação entre AFC e NMC bem como entre as frequências dos fungos nos discos foliares. Para os dados de sobrevivência epifítica de *C. rosea*, procedeu-se à análise descritiva das médias.

Para as variáveis relacionadas ao perfil metabólico, verificou-se que a data de coleta não afetou significativamente os conteúdos dos metabólitos em cada tratamento ($P > 0,05$). Assim, foi possível juntar os dados de todas as coletas para cada tratamento e estudar o perfil metabólico com maior número de repetições, especialmente para os tratamentos Cr7 e Test (16 repetições). Um heat map foi gerado, com auxílio do MetaboAnalyst 3.0 (Xia et al., 2015), a partir das médias dos conteúdos relativos de cada metabólito. Efetuou-se a ANOVA e compararam-se as médias entre cada tratamento com *C. rosea* e a testemunha (Fisher's LSD, $\alpha = 0,05$). Para todas as análises estatísticas, usou-se o programa SAS® v. 9.1.

4. RESULTADOS

4.1. Experimento em câmara de crescimento

4.1.1. Colonização foliar por *Clonostachys rosea* e *Botrytis cinerea*

Houve correlação negativa entre AFC e NMC ($r_s = -0,60$). A AFC diferiu significativamente entre tratamentos com e sem aplicação do antagonista ($P < 0,0001$) e não diferiu entre os tratamentos em que se aplicou *C. rosea*, nos quais AFC foi de aproximadamente 20%. A aplicação de *C. rosea* reduziu o NMC independentemente do tempo de aplicação relativo à inoculação de *B. cinerea* ($P < 0,0001$). O NMC atingiu 88,7 quando se inoculou *B. cinerea* na ausência de *C. rosea*, e atingiu o máximo de 20,9 na presença do antagonista. Quando não se inoculou o patógeno (Água+Cr e Água+Água), o NMC de *B. cinerea* foi 3,0 e 6,7, respectivamente (Fig. 1).

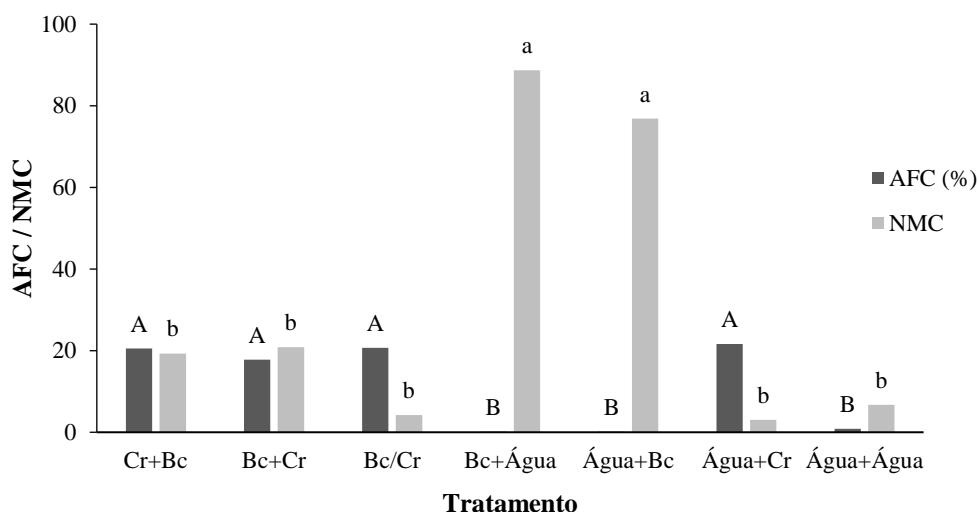


Figura 1. Área foliar com esporulação de *Clonostachys rosea* (AFC) e número médio de conidióforos de *Botrytis cinerea* (NMC) em folhas de morangueiros em câmara de crescimento, nos tratamentos: aplicação de *C. rosea* 24 h antes (Cr+Bc) ou após (Bc+Cr) inocular *B. cinerea*; simultaneamente à inoculação (Bc/Cr); inoculação de *B. cinerea* 24h antes (Bc+Água) ou após (Água+Bc) aplicar água; aplicação de *C. rosea* 24 h após aplicar água (Água+Cr); e duas aplicações de água espaçadas de 24 h (Água+Água). Duas execuções, com cinco repetições por execução. As médias de AFC seguidas das mesmas letras maiúsculas e as de NMC seguidas das mesmas minúsculas não diferem entre si (teste de Tukey, $\alpha = 0,05$).

Correlação negativa também ocorreu entre as frequências de *C. rosea* e *B. cinerea* ($r_s = -0,48$). A frequência de *C. rosea* em discos foliares diferiu com a aplicação de *C. rosea* ($P < 0,0001$), mas não diferiu entre os tratamentos em que se aplicou o antagonista (Fig. 2). A frequência de *B. cinerea* diferiu entre os tratamentos, e atingiu 93% na ausência de *C. rosea*. Nos tratamentos não inoculados com *B. cinerea*, as frequências do patógeno foram 14,7 para Água+Cr e 27% para Água+Água (Fig. 2).

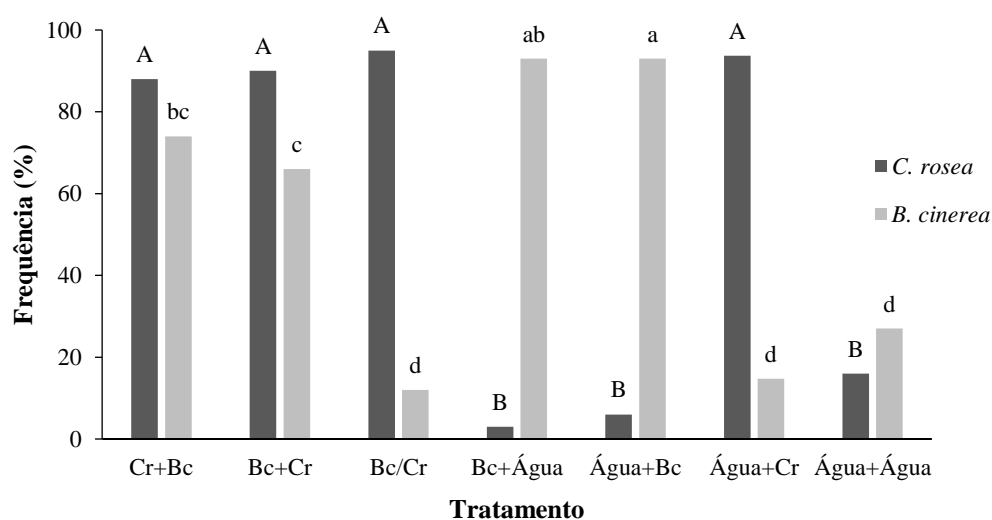


Figura 2. Frequência de *Clonostachys rosea* e de *Botrytis cinerea* em folhas de morangueiros em câmara de crescimento, nos tratamentos: aplicação de *C. rosea* 24 h antes (Cr+Bc) ou após (Bc+Cr) inocular *B. cinerea*; simultaneamente à inoculação (Bc/Cr); inoculação de *B. cinerea* 24 h antes (Bc+Água) ou após (Água+Bc) aplicar água; aplicação de *C. rosea* 24 h após aplicar água (Água+Cr); e duas aplicações de água espaçadas de 24 h (Água+Água). Duas execuções, com cinco repetições por execução. As frequências de *C. rosea* seguidas das mesmas letras maiúsculas e as de *B. cinerea* seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem entre si (teste de Fisher, LSD, $\alpha = 0,05$).

4.1.2. Sobrevivência epifítica de *Clonostachys rosea*

A sobrevivência epifítica de *C. rosea* em folhas de morangueiro variou entre as duas execuções experimentais. Na primeira, foi possível contar UFC nas diluições realizadas no mesmo dia da aplicação dos tratamentos, com média de $5,5 \times 10^4$

UFC/folículo. Aos 3, 6, 9 e 12 dias após aplicação, apesar da presença de *C. rosea*, o número de UFC por placa foi muito baixo, impossibilitando contagem dentro da faixa previamente estabelecida (30 – 300 UFC/placa). Na segunda execução, foi possível contar as colônias até 15 dias após a aplicação, e houve tendência de aumento da população aos 12 dias. Houve redução rápida do número de UFC aos 3 dias da aplicação, de $1,5 \times 10^5$ para $5,9 \times 10^3$ UFC/folículo. A população se manteve constante aos 6 dias e ultrapassou 5×10^4 UFC/folículo aos 12 e 15 dias após a aplicação (Fig. 3).

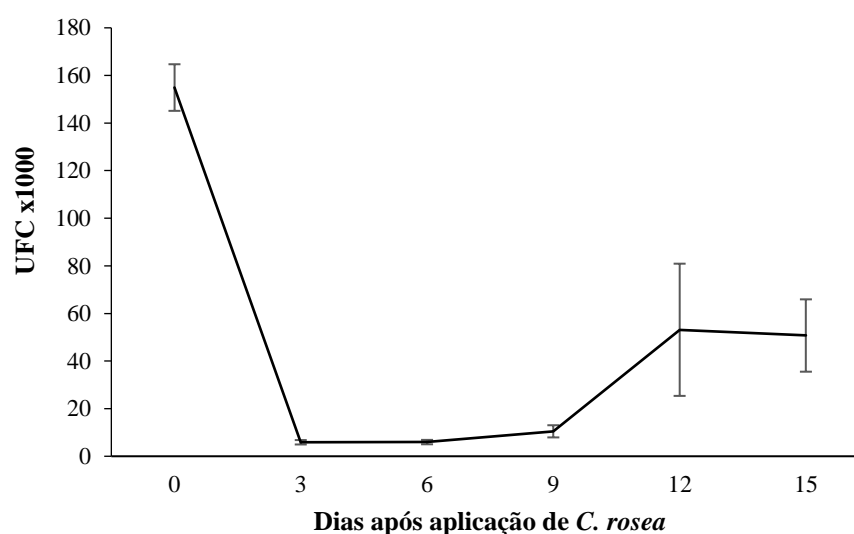


Figura 3. Sobrevivência epifítica de *Clonostachys rosea*, avaliada por meio do número de unidades formadoras de colônias por folículo (UFC), em morangueiros mantidos em câmara de crescimento. Dados da segunda execução, com cinco repetições. As barras verticais representam o erro padrão da média.

4.2. Experimentos em campos comerciais

4.2.1. Colonização foliar por *Clonostachys rosea* e *Botrytis cinerea*

Em Ervália, houve efeito significativo do intervalo de aplicação sobre a AFC e o NMC ($P < 0,0001$). Detectou-se correlação negativa entre AFC e NMC ($r_s = -0,83$) e entre as frequências de *C. rosea* e de *B. cinerea* ($r_s = -0,77$). A AFC foi de 27% com aplicação semanal de *C. rosea*, e tendeu a diminuir com o aumento do intervalo de aplicação (Fig. 4A). A aplicação de *C. rosea* reduziu o NMC de *B. cinerea*

independentemente do intervalo de aplicação ($P < 0,0001$), com média de 1,03 conidióforo na aplicação semanal de *C. rosea* e 83,6 conidióforos sem aplicação (Fig. 4A). A frequência de *C. rosea* em discos foliares diferiu entre os tratamentos e atingiu 100% nos intervalos de aplicação de 7 e 14 dias. A frequência de *B. cinerea* foi de 2,8% com aplicação semanal de *C. rosea* e 62,8% sem aplicação (Fig. 4B).

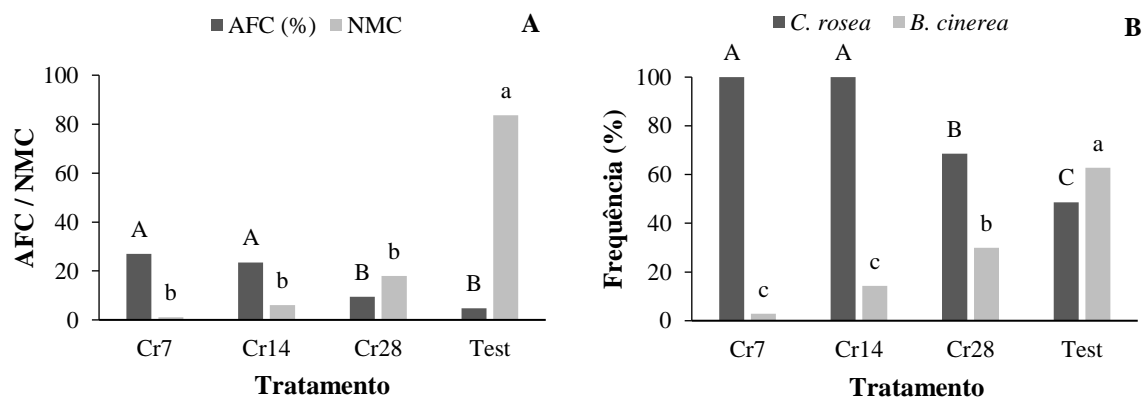


Figura 4. Área foliar com esporulação de *Clonostachys rosea* (AFC) e número médio de conidióforos de *Botrytis cinerea* (NMC) (A) e frequências dos fungos (B) em folhas de morangueiros coletadas em Ervália, MG. Os tratamentos foram: aplicação de *C. rosea* a cada 7 (Cr7), 14 (Cr14) ou 28 (Cr28) dias ou sem aplicação (Test). As médias de AFC e as frequências de *C. rosea* seguidas das mesmas letras maiúsculas, bem como as médias de NMC e as frequências de *B. cinerea* seguidas das mesmas letras minúsculas, não diferem entre si (teste de Tukey, $\alpha = 0,05$).

Para o campo comercial em Coimbra, não houve correlação entre AFC e NMC ($P=0,8782$) nem entre as frequências dos fungos ($P=0,8552$). O intervalo de aplicação afetou significativamente a AFC ($P < 0,0001$), mas não o NMC ($P=0,8231$). A AFC atingiu 23% com aplicação semanal, e o NMC variou de 10,4 a 25,5 (Fig. 5A). A frequência de *C. rosea* foi maior com aplicação semanal (75,7%); nos demais tratamentos a frequência variou de 15,7 a 18,6%. Para *B. cinerea*, as frequências variaram de 18,6 a 28,6% e não diferiram entre os tratamentos (Fig. 5B).

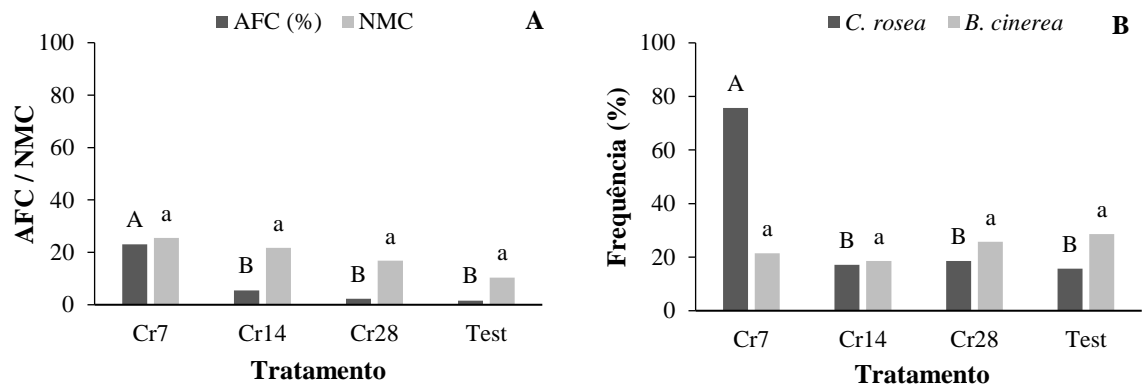


Figura 5. Área foliar colonizada por *C. rosea* (AFC) e número médio de conidióforos de *Botrytis cinerea* (NMC) (A) e frequências dos fungos (B) em folhas de morangueiros coletadas em Coimbra, MG. Aplicou-se *C. rosea*, a intervalos de 7 (Cr7), 14 (Cr14) ou 28 (Cr28) dias, ou não (Test). As médias de AFC e as frequências de *C. rosea* seguidas das mesmas letras maiúsculas, bem como as médias de NMC e as frequências de *B. cinerea* seguidas das mesmas letras minúsculas, não diferem entre si (teste de Tukey, $\alpha = 0,05$).

4.2.2. Sobrevivência epifítica de *Clonostachys rosea*

Para ambos os experimentos de campo, colônias do antagonista foram visualizadas nas placas, mas não se recuperaram populações epifíticas de *C. rosea* na faixa preestabelecida para contagem de UFC de maneira confiável.

4.2.3. Perfil metabólico de morangueiros

A aplicação semanal de *C. rosea* (Cr7) resultou em um perfil metabólico diferenciado, com conteúdos relativos de metabólitos primários e secundários mais elevados (Fig. 6). O agrupamento formado entre os tratamentos no heat map sugere que as mudanças metabólicas podem ser detectadas por análise do perfil metabólico até 6 dias após a aplicação de *C. rosea*. Ademais, à medida que o intervalo entre a última aplicação e a coleta aumenta para 13 ou 27 dias, o perfil metabólico se assemelha àquele observado para a testemunha.

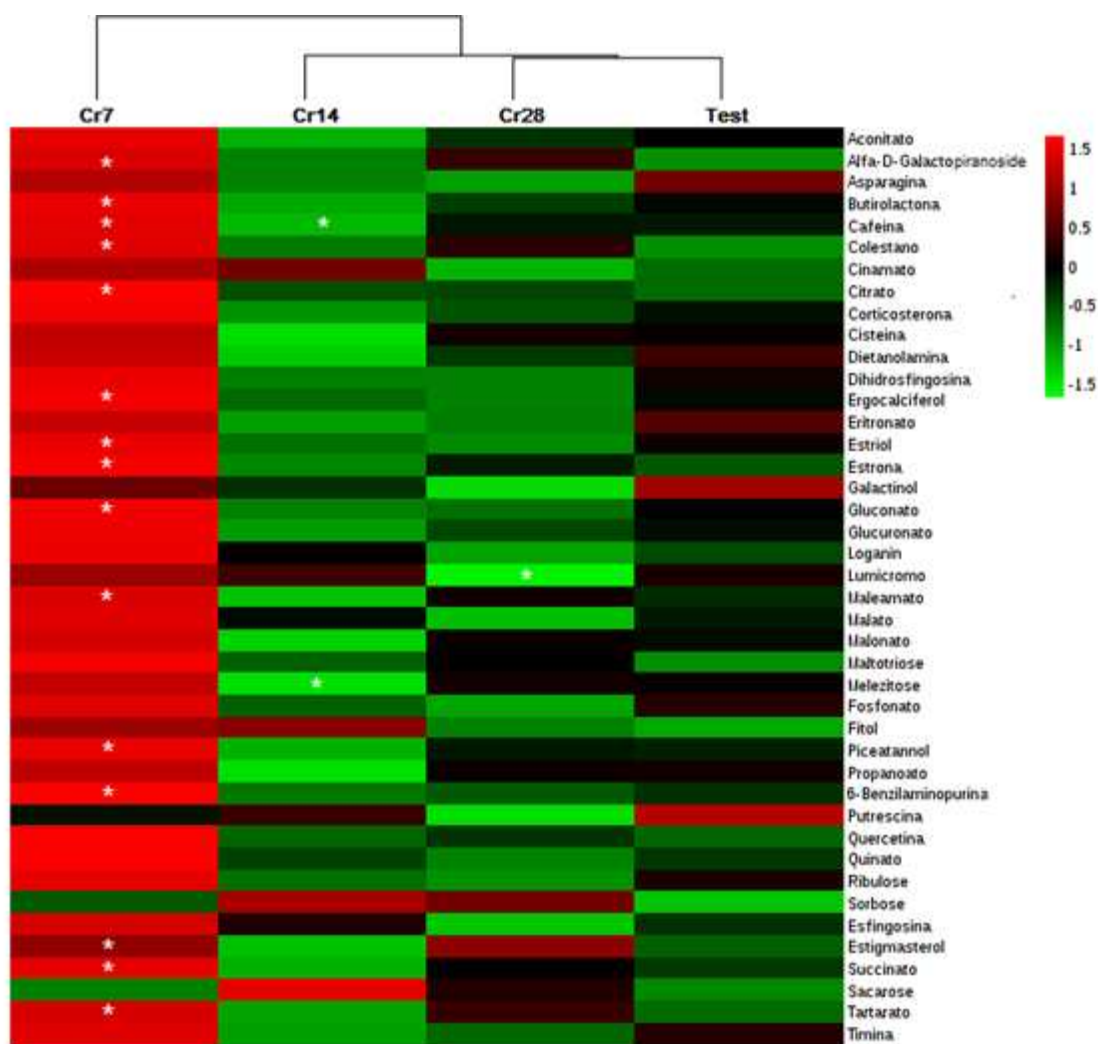


Figura 6. Conteúdos relativos de metabólitos em folhas de morangueiros quando se aplicou *Clonostachys rosea*, em intervalos de 7 (Cr7), 14 (Cr14) ou 28 (Cr28) dias, ou não (Test). O heat map representa as mudanças nos conteúdos relativos de metabólitos. Menores valores recebem cor verde, maiores valores, cor vermelha. Asteriscos (*) representam diferença significativa em relação à testemunha (teste de Fisher, LSD, $\alpha = 0,05$).

5. DISCUSSÃO

O fungo *C. rosea* é amplamente reconhecido como antagonista a *B. cinerea*, com eficiência comprovada no manejo do mofo cinzento em experimentos em câmara de crescimento e campo (Borges et al., 2015; Sutton et al., 2015; Silvera-Pérez et al., 2010; Cota et al., 2008b; Morandi et al., 2008; Morandi et al., 2003; Sutton et al.,

1997). Ademais, *C. rosea* se estabelece endofiticamente (Morandi et al., 2001; Sutton et al., 1997) e pode promover aumentos no crescimento e/ou produção de plantas (Sutton et al., 2015; Cota et al., 2008b; Johansen et al., 2005), o que leva a questionar os efeitos da colonização, não apenas sobre a dinâmica populacional do patógeno, mas também, sobre o metabolismo da planta. Assim, nesse trabalho estudou-se a interação de *C. rosea*, *B. cinerea* e morangueiros com base na dinâmica populacional dos fungos e no perfil metabólico de morangueiros.

De modo geral, o antagonista se estabeleceu em folhas de morangueiros e afetou negativamente a colonização do tecido foliar por *B. cinerea*, como previamente observado (Cota et al., 2009; Cota et al., 2008a; Morandi et al., 2001). Em câmara de crescimento, quando *C. rosea* foi aplicado simultaneamente à inoculação de *B. cinerea*, a frequência do patógeno foi tão baixa quanto quando não se inoculou o patógeno (Fig. 2), o que corrobora outros trabalhos (Borges et al., 2015; Sutton and Peng, 1993). Ademais, a inoculação de *B. cinerea* não afetou a colonização dos tecidos por *C. rosea*, o que evidencia a habilidade competitiva do antagonista e seu potencial no biocontrole do mofo cinzento (Borges et al., 2015; Nobre et al., 2005; Morandi et al., 2001; Morandi et al., 2000). A eficiência de *C. rosea* em se estabelecer e colonizar os tecidos vegetais está relacionada a diversos fatores, como a concentração da suspensão de conídios usada. Quando o antagonista foi aplicado sobre folhas de roseira, o nível de colonização dos tecidos foi maior para concentrações de 10^5 - 10^6 conídios.mL⁻¹ que 10^3 - 10^4 conídios.mL⁻¹ (Morandi et al., 2001). Em geral, concentrações entre 10^6 e 10^8 conídios.mL⁻¹ de *C. rosea* são efetivas no biocontrole do mofo cinzento (Borges et al., 2015; Sutton et al., 1997) e parecem dar vantagem para o antagonista na competição com microrganismos indígenas (Morandi et al., 2001).

Por outro lado, a sobrevivência epifítica do antagonista sobre morangueiros pode não ser expressiva como a sobrevivência endofítica, condição na qual o fungo está mais protegido (Cota et al., 2008a). Quando se quantificou a população epifítica ao longo do tempo, observou-se um decréscimo substancial sobre o número de UFC/folículo aos 3 dias da aplicação. Esse rápido decréscimo da população epifítica nos primeiros dias parece ser comum para agentes de biocontrole (Chatterton and Punja, 2012; Freeman et al., 2004; Köhl et al., 2000) e sugere que, após a aplicação, grande parte dos conídios germina, dando início à colonização endofítica e, assim, a densidade de conídios na superfície foliar diminui rapidamente. No caso de *C. rosea*, os conídios podem germinar e dar início à colonização endofítica em menos de 24 h após a aplicação (Saraiva et al., 2014). Ainda assim, nós observamos uma população epifítica entre 10^3 e 10^4 UFC/folículo durante todo o período de avaliação (Fig. 3), concentração considerada suficiente para suprimir *B. cinerea* em folhas de morangueiro em condições controladas de temperatura e umidade (Nobre, 2003).

Para os experimentos em campo, a colonização foliar por *C. rosea* reduziu à medida que se aumentou o intervalo entre aplicação e coleta de amostras, como observado por Cota et al. (2008a). Conseqüentemente, a colonização foliar por *B. cinerea* aumentou progressivamente em Ervália, o que evidencia a correlação negativa dos níveis de colonização dos dois fungos (Fig. 4). Em Coimbra, a frequência e a colonização foliar por *B. cinerea* foram baixas, e não diferiram entre os tratamentos, o que impossibilitou observar o efeito da aplicação de *C. rosea* na colonização do patógeno, ainda que o antagonista tenha sido aplicado semanalmente (Fig. 5). As médias de temperatura e umidade relativa foram semelhantes para Coimbra, cultivo em campo aberto (18,5°C; 77%), e Ervália, cultivo protegido (18,9°C; 73%) no período experimental, mas as amplitudes diárias de temperatura e umidade relativa

foram maiores em Ervália. Variações bruscas na umidade relativa são determinantes para a dispersão de conídios de *B. cinerea* (Jarvis, 1980). Ademais, alguns autores encontraram correlação positiva entre idade da planta e severidade do mofo cinzento (Borges et al., 2014; Keressies, 1993). Assim, é possível que diferenças na pressão de inóculo do patógeno e/ou na idade das plantas expliquem a baixa colonização foliar por *B. cinerea* em Coimbra. Aqui, as plantas estavam com 57 dias após o plantio no início do experimento, enquanto em Ervália as plantas tinham cerca de um ano nesse experimento, mas haviam estufas ao lado com cultivo de dois anos, e nesse sistema protegido sempre há plantas no campo.

A maior eficiência no biocontrole do mofo cinzento em morangueiros no campo parece depender da manutenção de populações elevadas de *C. rosea* nos tecidos vegetais, por meio de aplicações frequentes (Cota et al., 2008b). A aplicação de *C. rosea* reduziu significativamente a colonização foliar por *B. cinerea* e a incidência do mofo cinzento em flores e frutos de morangueiros, além de promover aumento de 75% na produção (Cota et al., 2009). Estes resultados são atribuídos ao antagonismo de *C. rosea*. Entretanto, acredita-se haver envolvimento de efeitos sobre o hospedeiro.

Nós investigamos as alterações no hospedeiro por meio da análise do perfil metabólico, e observamos maiores conteúdos relativos de diversos compostos do metabolismo primário e secundário de morangueiros com aplicações semanais de *C. rosea* (Fig. 6), o que resultou em um perfil metabólico diferenciado dos demais tratamentos. Houve aumento significativo nos conteúdos relativos de citrato e succinato, intermediários do ciclo de Krebs, que estão relacionados a diversos processos bioquímicos, como fotossíntese e respostas a estresses bióticos (Finkemeier et al., 2013). Essas mudanças também foram observadas em raízes de *Arabidopsis*

thaliana colonizadas por *Trichoderma asperelloides* (Brotman et al., 2012). Também houve aumento de compostos do metabolismo secundário, como a cafeína, que estimula o sistema de defesa endógeno e aumenta a resistência a patógenos (Kim and Sano, 2008), e piceatannol, composto fenólico análogo de resveratrol que pode atuar como fitoalexina (Brinker and Seigler, 1991). De fato, *C. rosea* induz mudanças metabólicas associadas a respostas de defesa em plantas de canola (*Brassica napus*) desafiadas com *Plasmodiophora brassicae*, possivelmente devido à super-regulação de genes envolvidos nas vias biossintéticas do ácido jasmônico, etileno e de fenilpropanoides (Lahlali and Peng, 2014). Indução de resistência sistêmica também foi mediada por *C. rosea* em plântulas de trigo tratadas com o antagonista e desafiadas com *Fusarium culmorum* (Roberti et al., 2008). Os autores ressaltam a participação ativa do hospedeiro no processo de biocontrole exercido por *C. rosea*, com redução da doença mediada pela ativação do sistema de defesa da planta. Em resumo, a aplicação semanal de *C. rosea* promove a manutenção da população do antagonista nos tecidos, bem como resulta em maiores conteúdos relativos de metabólitos primários e secundários ao longo do tempo, o que pode estar diretamente relacionado com o suprimento de energia necessário para ativar o sistema de defesa e promover o crescimento da planta (Brotman et al., 2012).

Em nosso laboratório, os trabalhos visando avaliar o potencial de *C. rosea* no biocontrole do mofo cinzento iniciaram na década de 90. Desde então, selecionaram-se isolados de condições brasileiras e avaliou-se a capacidade de estabelecimento, colonização e supressão de *B. cinerea*, com resultados promissores em diversas espécies hospedeiras (Borges et al., 2015; Saraiva et al., 2014; Cota et al., 2009; Cota et al., 2008a; Nobre et al., 2005; Nobre, 2003). Os mecanismos de ação mais estudados são de efeito direto sobre o patógeno, como competição, hiperparasitismo e

antibiose. A aplicação do antagonista pode, ainda, induzir resistência sistêmica (Lahlali and Peng, 2014; Roberti et al., 2008) e promover aumentos em crescimento e produção da planta (Sutton et al., 2015; Cota et al., 2009; Cota et al., 2008b; Johansen et al., 2005). Mas sabe-se que uma interação tripla patógeno-hospedeiro-antagonista pode envolver outros aspectos, ainda não bem elucidados. Esta foi a primeira vez que se investigou a interação de *C. rosea*, *B. cinerea* e morangueiros correlacionando dados de dinâmica populacional dos fungos e do perfil metabólico da planta. Sugere-se que a promoção de crescimento e sanidade da planta tem relação com alterações metabólicas induzidas por *C. rosea* quando aplicado frequentemente. Espera-se que este trabalho contribua para novos estudos, visando elucidar o mecanismo de ação de agentes de biocontrole e os impactos de sua aplicação sobre a fisiologia do hospedeiro, principalmente sobre respostas de crescimento, produção e sanidade.

6. CONCLUSÕES

Clonostachys rosea se estabeleceu e colonizou eficientemente folhas de morangueiros em câmara de crescimento e em campo;

A população epifítica de *C. rosea* reduziu rapidamente após a aplicação;

O antagonista foi eficiente em suprimir a colonização de *Botrytis cinerea*;

Aplicações semanais são necessárias para manter o nível de colonização pelo antagonista elevado, visto que a população diminui ao longo tempo;

A aplicação semanal de *C. rosea* proporcionou a manutenção de maiores conteúdos relativos de compostos do metabolismo primário e secundário, que podem estar associados à promoção de crescimento, produção, e respostas de defesa da planta.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aliferis, K.A., Faubert, D., Jabaji, S., 2014. A metabolic profiling strategy for the dissection of plant defense against fungal pathogens. *PLoS ONE* 9.
- Allwood, J.W., Ellis, D.I., Goodacre, R., 2008. Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant–host interactions. *Physiologia Plantarum* 132, 117-135.
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M., 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57, 233-266.
- Bakeerathan, G., Samita, S., 2003. A non-parametric approach in testing higher order interactions. *Sri Lankan Journal of Applied Statistics* 4, 15-25.
- Borges, A.V., Saraiva, R.M., Maffia, L.A., 2014. Key factors to inoculate *Botrytis cinerea* in tomato plants. *Summa Phytopathologica* 40, 221-225.
- Borges, A.V., Saraiva, R.M., Maffia, L.A., 2015. Biocontrol of gray mold in tomato plants by *Clonostachys rosea*. *Tropical Plant Pathology* 40, 71-76.
- Brinker, A.M., Seigler, D.S., 1991. Isolation and identification of piceatannol as a phytoalexin from sugarcane. *Phytochemistry* 30, 3229-3232.
- Brotman, Y., Lisec, J., Meret, M., Chet, I., Willmitzer, L., Viterbo, A., 2012. Transcript and metabolite analysis of the *Trichoderma*-induced systemic resistance response to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis thaliana*. *Microbiology* 158, 139-146.
- Cadle-Davidson, L., 2008. Monitoring pathogenesis of natural *Botrytis cinerea* infections in developing grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture* 59, 387-395.
- Camañes, G., Scalschi, L., Vicedo, B., González-Bosch, C., García-Agustín, P., 2015. An untargeted global metabolomic analysis reveals the biochemical changes underlying basal resistance and priming in *Solanum lycopersicum*, and identifies 1-methyltryptophan as a metabolite involved in plant responses to *Botrytis cinerea* and *Pseudomonas syringae*. *The Plant Journal* 84, 125-139.
- Chatterton, S., Jayaraman, J., Punja, Z.K., 2008. Colonization of cucumber plants by the biocontrol fungus *Clonostachys rosea* f. *catenulata*. *Biological Control* 46, 267-278.
- Chatterton, S., Punja, Z.K., 2012. Colonization of geranium foliage by *Clonostachys rosea* f. *catenulata*, a biological control agent of botrytis grey mould. *Botany* 90, 1-10.
- Cota, L.V., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G., 2008a. Brazilian isolates of *Clonostachys rosea*: colonization under different temperature and moisture conditions and temporal dynamics on strawberry leaves. *Letters in Applied Microbiology* 46, 312-317.
- Cota, L.V., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G., Macedo, P.E.F., 2009. Biological control by *Clonostachys rosea* as a key component in the integrated management of strawberry gray mold. *Biological Control* 50, 222-230.
- Cota, L.V., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G., Macedo, P.E.F., Antunes, R.F., 2008b. Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. *Biological Control* 46, 515-522.
- Cuadros-Inostroza, A., Caldana, C., Redestig, H., Kusano, M., Lisec, J., Pena-Cortes, H., Willmitzer, L., Hannah, M.A., 2009. TargetSearch - a Bioconductor package for the

- efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data. *BMC Bioinformatics* 10, 428.
- Diguta, C.F., Rousseaux, S., Weidmann, S., Bretin, N., Vincent, B., Guilloux-Benatier, M., Alexandre, H., 2010. Development of a qPCR assay for specific quantification of *Botrytis cinerea* on grapes. *FEMS Microbiology Letters* 313, 81-87.
- Doehlemann, G., Wahl, R., Horst, R.J., Voll, L.M., Usadel, B., Poree, F., Stitt, M., Pons-Kühnemann, J., Sonnewald, U., Kahmann, R., Kämper, J., 2008. Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *The Plant Journal* 56, 181-195.
- Dulermo, T., Bligny, R., Gout, E., Cotton, P., 2009. Amino acid changes during sunflower infection by the necrotrophic fungus *B. cinerea*. *Plant Signaling & Behavior* 4, 859-861.
- Fernie, A.R., Aharoni, A., Willmitzer, L., Stitt, M., Tohge, T., Kopka, J., Carroll, A.J., Saito, K., Fraser, P.D., DeLuca, V., 2011. Recommendations for reporting metabolite data. *The Plant Cell* 23, 2477-2482.
- Finkemeier, I., König, A.C., Heard, W., Nunes-Nesi, A., Pham, P.A., Leister, D., Fernie, A.R., Sweetlove, L.J., 2013. Transcriptomic analysis of the role of carboxylic acids in metabolite signaling in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology* 162, 239-253.
- Freeman, S., Minz, D., Kolesnik, I., Barbul, O., Zveibil, A., Maymon, M., Nitzani, Y., Kirshner, B., Rav-David, D., Bilu, A., Dag, A., Shafir, S., Elad, Y., 2004. *Trichoderma* Biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and Survival in Strawberry. *European Journal of Plant Pathology* 110, 361-370.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2, 43-56.
- Jarvis, W.R., 1980. Epidemiology. In COLEY-SMITH, J.R., VERHOEFF, F. & JARVIS, W.R. (Eds.). *The Biology of Botrytis*. London. Academic Press, 219-250.
- Johansen, A., Knudsen, I.M.B., Binnerup, S.J., Winding, A., Johansen, J.E., Jensen, L.E., Andersen, K.S., Svenning, M.M., Bonde, T.A., 2005. Non-target effects of the microbial control agents *Pseudomonas fluorescens* DR54 and *Clonostachys rosea* IK726 in soils cropped with barley followed by sugar beet: a greenhouse assessment. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 2225-2239.
- Jones, O.H., Maguire, M., Griffin, J., Jung, Y.-H., Shibato, J., Rakwal, R., Agrawal, G., Jwa, N.-S., 2011. Using metabolic profiling to assess plant-pathogen interactions: an example using rice (*Oryza sativa*) and the blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *European Journal of Plant Pathology* 129, 539-554.
- Kastelein, P., Krijger, M., Czajkowski, R., van der Zouwen, P.S., van der Schoor, R., Jalink, H., van der Wolf, J.M., 2014. Development of *Xanthomonas fragariae* populations and disease progression in strawberry plants after spray-inoculation of leaves. *Plant Pathology* 63, 255-263.
- Kerssies, A., 1993. Influence of environmental conditions on dispersal of *Botrytis cinerea* conidia and on post-harvest infection of gerbera flowers grown under glass. *Plant Pathology* 42, 754-762.
- Kim, Y.-S., Sano, H., 2008. Pathogen resistance of transgenic tobacco plants producing caffeine. *Phytochemistry* 69, 882-888.

- Köhl, J., Gerlagh, M., Grit, G., 2000. Biocontrol of *Botrytis cinerea* by *Ulocladium atrum* in Different Production Systems of Cyclamen. *Plant Disease* 84, 569-573.
- Kretschmer, M., Leroch, M., Mosbach, A., Walker, A.-S., Fillinger, S., Mernke, D., Schoonbeek, H.-J., Pradier, J.-M., Leroux, P., De Waard, M.A., Hahn, M., 2009. Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *PLoS Pathogens* 5.
- Lahlali, R., Peng, G., 2014. Suppression of clubroot by *Clonostachys rosea* via antibiosis and induced host resistance. *Plant Pathology* 63, 447-455.
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., Fernie, A.R., 2006. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *NATURE PROTOCOLS* 1, 387-396.
- Lugtenberg, B.J., Chin, A.W.T.F., Bloemberg, G.V., 2002. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 373-383.
- Massart, S., Perazzolli, M., Höfte, M., Pertot, I., Jijakli, M.H., 2015. Impact of the omic technologies for understanding the modes of action of biological control agents against plant pathogens. *BioControl*, 1-22.
- Mirmajlessi, S.M., Destefanis, M., Gottsberger, R.A., Mand, M., Loit, E., 2015. PCR-based specific techniques used for detecting the most important pathogens on strawberry: a systematic review. *Syst Rev* 4, 9.
- 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., Mattos, L.P.V., Santos, E.R., Bonugli, R.C., 2008. Influence of application time on the establishment, survival, and ability of *Clonostachys rosea* to suppress *Botrytis cinerea* sporulation on rose debris. *Crop Protection* 27, 77-83.
- 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., 2003. Isolados brasileiros de *Clonostachys rosea* com potencial para biocontrole de *Botrytis cinerea*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, Brasil.
- Nobre, S.A.M., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G., Cota, L.V., Dias, A.P.S., 2005. Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. *Biological Control* 34, 132-143.
- Palazzini, J.M., Groenenboom-de Haas, B.H., Torres, A.M., Köhl, J., Chulze, S.N., 2013. Biocontrol and population dynamics of *Fusarium* spp. on wheat stubble in Argentina. *Plant Pathology* 62, 859-866.
- Park, Y.-H., Stack, J., Kenerley, C., 1992. Selective isolation and enumeration of *Gliocladium virens* and *G. roseum* from soil. *Plant Disease* 76, 230-235.

- Peng, G., Sutton, J.C., 1991. Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. *Canadian Journal of Plant Pathology* 13, 247-257.
- Ravnskov, S., Jensen, B., Knudsen, I.M.B., Bødker, L., Funck Jensen, D., Karliński, L., Larsen, J., 2006. Soil inoculation with the biocontrol agent *Clonostachys rosea* and the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* results in mutual inhibition, plant growth promotion and alteration of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 3453-3462.
- Roberti, R., Veronesi, A., Cesari, A., Cascone, A., Di Bernardino, I., Bertini, L., Caruso, C., 2008. Induction of PR proteins and resistance by the biocontrol agent *Clonostachys rosea* in wheat plants infected with *Fusarium culmorum*. *Plant Science* 175, 339-347.
- Saraiva, R.M., Czymmek, K.J., Borges, A.V., Caires, N.P., Maffia, L.A., 2014. Confocal microscopy study to understand *Clonostachys rosea* and *Botrytis cinerea* interactions in tomato plants. *Biocontrol Science and Technology* 25, 56-71.
- Silvera-Pérez, A.E., Valdebenito-Sanhueza, R.M., Duarte, V., Santos, H.P., Felippeto, J., 2010. Controle do mofo cinzento com *Clonostachys rosea* na produção de mudas de fúcsia. *Tropical Plant Pathology* 35, 163-169.
- Suarez, M.B., Walsh, K., Boonham, N., O'Neill, T., Pearson, S., Barker, I., 2005. Development of real-time PCR (TaqMan®) assays for the detection and quantification of *Botrytis cinerea* in planta. *Plant Physiology and Biochemistry* 43, 890-899.
- Sutton, J., Peng, G., 1993. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. *Phytopathology* 83, 615-621.
- 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., Rooney, B., Mason, T., 2015. Blueberry yields heightened in response to *Clonostachys* spray treatments. Disponível em: <http://peiwildblueberries.com/blueberry-yields-heightened-in-response-to-clonostachys-spray-treatment/>.
- 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.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Barbetti, M.J., Li, H., Woo, S.L., Lorito, M., 2008. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 72, 80-86.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., Van Kan, J.A.L., 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* 8, 561-580.
- Xia, J., Sinelnikov, I.V., Han, B., Wishart, D.S., 2015. MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Research*.
- Zhang, T., Fang, H.H., 2006. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70, 281-289.