

PAULO EDUARDO FRANÇA DE MACEDO

PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTAS MEDIADA
POR *Clonostachys rosea*

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
2011

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M141p
2011

Macedo, Paulo Eduardo França, 1986-
Promoção do crescimento de plantas mediada por
Clonostachys rosea / Paulo Eduardo França Macedo.
– Viçosa, MG, 2011.
vi, 36f. : il. ; 29cm.

Orientador: Luiz Antônio Maffia.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 30-36.

1. Crescimento (Plantas). 2. *Clonostachys rosea*. 3. Plantas
- Doenças e pragas - Controle integrado. 4. Pragas - Controle
biológico. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 571.82

PAULO EDUARDO FRANÇA DE MACEDO

PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTAS MEDIADA
POR *Clonostachys rosea*

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: 21 de fevereiro de 2011.

Prof^a. Rosângela D'Arc de L. Oliveira

Prof. Fabrício de Ávila Rodrigues

Dr. Luciano Viana Cota

Prof. Luiz Antonio Maffia
(Orientador)

Aos meus pais,
José Alberto e Sandra Regina,
dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela graça concedida.

Aos meus pais, José Alberto e Sandra Regina, e a meu irmão Pedro, pelo carinho e apoio.

A minha namorada Simone, pelo carinho e compreensão.

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

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

À Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa.

A todos do Laboratório de Controle Biológico que me auxiliaram na realização deste trabalho.

Aos professores Fabrício de Ávila Rodrigues e Rosângela D'Arc de Lima Oliveira, e ao Dr. Luciano Viana Cota, pelas sugestões e críticas.

Aos demais professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos durante o curso.

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

Muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT.....	vi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Aspectos gerais	3
2.2 Benefícios do uso de agentes de biocontrole	4
2.3 <i>Clonostachys rosea</i> como agente de biocontrole.....	6
2.4 Outros benefícios de <i>Clonostachys rosea</i>	9
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Produção de <i>Clonostachys rosea</i>	12
3.2. Material vegetal.....	12
3.3. Redução do tempo de emergência	13
3.4. Promoção de crescimento	13
4 RESULTADOS.....	15
4.1 Redução do tempo de emergência	15
4.2 Promoção de crescimento	17
5 DISCUSSÃO	24
6 CONCLUSÕES	29
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

RESUMO

MACEDO, Paulo Eduardo França de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Promoção do crescimento de plantas mediada por *Clonostachys rosea***. Orientador: Luiz Antonio Maffia.

Agentes de biocontrole, além de antagonizar patógenos, podem ainda mediar outros benefícios às plantas, como a promoção de crescimento. O antagonismo de quatro isolados brasileiros de *Clonostachys rosea* a *Botrytis cinerea* é bem conhecido, mas ainda não se sabe se esses isolados podem promover o crescimento de plantas. Assim, objetivou-se avaliar se os quatro isolados poderiam reduzir o tempo de emergência e promover o crescimento de plantas de 17 espécies vegetais cultivadas comercialmente. Para o tempo de emergência, compararam-se seis tratamentos aplicados em sementes: água (testemunha), suspensão de 10^7 conídios.mL⁻¹ de cada um dos quatro isolados e a mistura dos isolados. Após o plantio, diariamente, avaliou-se a emergência das plântulas. Para promoção de crescimento, compararam-se os seis tratamentos, em três números de aplicações: no plantio; no plantio e 7 dias após; e no plantio, 7 e 14 dias após. Após 35 dias do plantio, avaliaram-se a altura e as matérias secas do sistema radicular e da parte aérea. Houve redução do tempo de emergência apenas em margarida. Em plantas de tomate, margarida, soja, eucalipto, petúnia e alyssum violeta, houve promoção do crescimento, com aumento da altura ou da matéria seca. O isolado NCR61/F destacou-se, por reduzir o tempo de emergência em margarida e promover o crescimento de plantas de quatro espécies vegetais. Maior número de aplicações de *C. rosea* não levou à maior promoção de crescimento. Concluiu-se que *C. rosea* tem potencial em promover o crescimento de plantas. É importante conduzir estudos para elucidar os mecanismos de promoção de crescimento e para avaliar a aplicação de *C. rosea* em condições de produção comercial de culturas.

ABSTRACT

MACEDO, Paulo Eduardo França de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Growth promotion of plants mediated by *Clonostachys rosea***. Adviser: Luiz Antonio Maffia.

Biocontrol agents can reduce the effect of pathogens, as well as mediate other benefits to plants, such as growth promotion. The antagonism of four Brazilian isolates of *Clonostachys rosea* to *Botrytis cinerea* is well known, but it was not studied yet whether they could promote the growth of plants. Therefore this study aimed to assess whether these four isolates could reduce the time of emergency and promote the growth of 17 plant species used commercially. Regarding the time of emergence, we compared six treatments applied to seeds: water (check), suspension of 10^7 conidia.mL⁻¹ of each the four isolates of *C. rosea* separately, and a mixture of the four isolates. After the planting, the emergence of seedlings was evaluated daily. Regarding the growth promotion, we compared the six treatments, at three application times: at planting; at planting and 7 days later; and at planting, 7 days and 14 days later. At 35 days after planting, we evaluated the height and dried matter of both root system and aerial part. Reduction in emergency time occurred only in daisy plants. Growth promotion, with the increase in height or dry matter, occurred in plants of six crops (tomato, daisy, soybean, eucalyptus, alyssum violet, and petunia). One isolate (NCR61/F) in special reduced emergence time in daisy and promoted plant growth of four plant species. Increased number of applications of *C. rosea* did not increase the growth promotion. It was concluded that *C. rosea* has potential to promote plant growth. It is important to undertake further studies to elucidate mechanisms of growth promotion, as well as to evaluate the application of *C. rosea* under commercial crop production.

1 INTRODUÇÃO

O uso de pesticidas na agricultura vem sofrendo restrições, principalmente em vista dos resíduos em alimentos, seleção de populações de patógenos resistentes, contaminação ambiental e dos riscos à saúde humana. Embora a quantidade de produtos comerciais em uso no controle biológico de doenças de plantas ainda seja pequena, cerca de 1%, e de os fungicidas representarem aproximadamente 15% do mercado mundial de pesticidas, o uso de agentes de biocontrole vem crescendo, principalmente no contexto do manejo integrado de doenças (Fravel, 2005). Com o manejo integrado, reduz-se a necessidade da aplicação de fungicidas e, conseqüentemente, a possibilidade de seleção de isolados resistentes, o que torna o controle mais estável e sustentável (Fravel, 2005; Shtienberg & Elad, 1997). Outras vantagens de se adotar o biocontrole incluem a redução de resíduos químicos nos alimentos, menor exposição dos aplicadores a agrotóxicos e menor contaminação do ambiente (Pertot et al., 2008).

Agentes de biocontrole, além de reduzir o efeito dos patógenos nas plantas, podem promover outros efeitos benéficos, que incluem a melhoria das condições fisiológicas, redução de estresses abióticos, melhoria da eficiência fotossintética, aumento da absorção de água e assimilação de nutrientes, o que torna as plantas mais saudáveis e produtivas (Shoresh et al., 2010). Em vista desses efeitos, os agentes de biocontrole podem promover o crescimento de plantas, fato já comprovado por vários autores (Gravel et al., 2007; Harman et al., 2008; Shoresh et al., 2010; Shoresh & Harman, 2008; Sutton et al., 2008). Entretanto, há poucos estudos sobre os mecanismos bioquímicos e genéticos associados ao maior crescimento das plantas. Redução do nível de etileno e produção de compostos estimulantes, como os reguladores de crescimento, são possíveis mecanismos envolvidos na promoção de crescimento de plantas (Dai et al., 2008; Gravel et al., 2007). Uma forma de usar os agentes de biocontrole é sua aplicação em sementes ou mudas, que é vantajosa, pois os microrganismos podem sobreviver e proliferar durante a estação de cultivo, podendo favorecer o controle de patógenos e, em alguns casos, promover o melhor desenvolvimento das plantas sem demandar aplicações repetidas (Bennett et al., 2009; Shoresh et al., 2010; Sutton et al., 2008; Xue, 2003).

Dentre os microrganismos com potencial de uso na agricultura, vem-se dando ênfase ao fungo *Clonostachys rosea* (Link Fries). O potencial de uso agrícola de *C. rosea* deve-se ao fato de esse microrganismo controlar diversos patógenos fúngicos (Cota et al., 2008b; Jensen et al., 2004; Krauss & Soberanis, 2001; Lahoz et al., 2004; Lubeck et al., 2002; Morandi et al., 2008; Sutton et al., 1997; Xue, 2003), poder parasitar insetos (Toledo et al., 2006; Vega et al., 2008) e cistos de nematóides dos gêneros *Heterodera* e *Globodera* (Sutton et al., 1997), além de ser endofítico e promover crescimento de plantas (Lubeck et al., 2002; Morandi et al., 2001; Sutton et al., 2008; 2002).

No Brasil, os trabalhos com *C. rosea* iniciaram-se na década de 1990 com o isolado canadense Pg 88-710 (Peng and Sutton, 1991), que foi eficiente em suprimir a esporulação de *Botrytis cinerea* em morangueiro e roseira (Morandi et al., 2006; 2003; Valdebenito-Sanhuenza et al., 1997). Selecionaram-se quatro isolados de *C. rosea* a partir de condições brasileiras (NCR19/F, NCR60/F, NCR61/F, NCR62/F), visando primeiramente o controle biológico de *B. cinerea* (Nobre et al., 2005). Esses quatro isolados reduziram a esporulação de *B. cinerea* em folhas de morangueiro, roseira, eucalipto e tomateiro (Nobre et al., 2005) e colonizaram folhas de morangueiro, independentemente do período de molhamento foliar, o que é vantagem competitiva sobre *B. cinerea* (Cota et al., 2008a). Em experimentos de campo realizados em Viçosa-MG, os quatro isolados brasileiros foram tão eficientes quanto fungicidas no controle de *B. cinerea* em morangueiro (Cota et al., 2009; 2008b).

Aspectos auto-ecológicos e a capacidade antagonista dos quatro isolados de *C. rosea* a *B. cinerea* já foram elucidados (Cota et al., 2009; 2008a; 2008b; Nobre et al., 2005). Porém, ainda não sabe se esses isolados, além de controlarem *B. cinerea*, podem ser benéficos às plantas por meio de outros mecanismos, como a promoção de crescimento. Assim, no presente trabalho objetivou-se estudar se os quatro isolados brasileiros de *C. rosea* podem promover o crescimento de plantas de 17 espécies vegetais cultivadas comercialmente. Especificamente, objetivou-se avaliar se: i) os isolados diferem quanto à capacidade de promover o crescimento e aumentar a velocidade de emergência das plântulas; ii) a aplicação da mistura de isolados é mais eficiente e estável que a aplicação individual; iii) maior número de aplicações de *C. rosea* resulta em maior promoção de crescimento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais

Atualmente, o controle de doenças baseia-se no uso intensivo de fungicidas, o que acarreta problemas sociais, econômicos e ambientais. Contaminação ambiental, resíduos em alimentos, risco à saúde humana e seleção de populações de isolados resistentes aos fungicidas são alguns dos problemas gerados pelo uso indiscriminado desses compostos (Elad & Evensen, 1995; Fravel, 2005; Morandi & Bettiol, 2009; Moyano et al., 2003; Pertot et al., 2008; Yourman et al., 2001; 2000).

Diante da necessidade de se buscarem alternativas de controle que sejam eficientes, menos agressivas ao homem e ambiente e mais sustentáveis, vem-se estudando o controle biológico, para reduzir ou substituir o uso de fungicidas (Cota et al., 2009; 2008b; Elad & Kirshner, 1993; Fravel, 2005; Shtienberg & Elad, 1997; Moyano et al., 2003). Embora a quantidade de produtos comerciais em uso no controle biológico de doenças de plantas ainda seja pequena, e os fungicidas químicos representarem aproximadamente 15% do mercado mundial de pesticidas, o uso de agentes de biocontrole vem crescendo, principalmente no contexto de manejo integrado de doenças (Fravel, 2005). Com o manejo integrado, reduz-se a necessidade da aplicação de fungicidas e, conseqüentemente, a possibilidade de seleção de isolados resistentes, o que torna o controle mais estável e sustentável. Em alguns casos, o uso de um agente de biocontrole é o melhor método de controle de doenças (Fravel, 2005; Shtienberg & Elad, 1997). Outras vantagens do biocontrole incluem a redução de resíduos químicos nos alimentos (Pertot et al., 2008), menor exposição dos aplicadores a agrotóxicos e menor contaminação do ambiente.

Há vários microrganismos selecionados como agentes de biocontrole, como *Trichoderma harzianum* (Elad & Kirshner, 1993; Elad, 1994), *T. inhamatum*, *Cladosporium oxysporum*, *Bacillus subtilis* (Tatagiba et al., 1998), *Penicillium chrysogenum* (Jackson et al., 1994), *Ulocladium atrum* (Kohl et al., 1999; 1998), *Candida oleophila* (Mercier & Wilson, 1994), *Pichia guilhermondii* e *Bacillus mycoides* (Guetsky et al., 2002; 2001) e *Clonostachys rosea* (Sutton et al., 1997).

2.2 Benefícios do uso de agentes de biocontrole

Além de reduzir o efeito dos patógenos nas plantas, a aplicação de agentes de biocontrole pode promover outros efeitos benéficos na plantas: melhoria das condições fisiológicas, redução de estresses abióticos, melhoria da eficiência fotossintética e aumento da assimilação de nutrientes, o que torna as plantas mais saudáveis e produtivas. (Bennett et al., 2009; Shores et al., 2010; Sutton et al., 2008).

Vários autores comprovaram a eficiência de agentes de biocontrole em melhorar o desenvolvimento de plantas (Gravel et al., 2007; Harman et al., 2008; Shores et al., 2010; Shores & Harman, 2008; Sutton et al., 2008), mas há poucos estudos sobre os mecanismos bioquímicos e genéticos associados ao melhor desenvolvimento. Redução do nível de etileno e produção de compostos estimulantes, como os reguladores de crescimento, são possíveis mecanismos envolvidos na indução de crescimento de plantas (Dai et al., 2008). Estudaram-se cinco espécies de bactérias e três espécies de fungos como possíveis promotores de crescimento de plântulas de tomate: *Pseudomonas putida* e *T. atroviridae* promoveram o crescimento de plântulas e produziram ácido indolacético (Gravel et al., 2007). Auxina, produzida por *T. virens* e *Piriformospora indica*, foi importante em promover o crescimento de *Arabidopsis thaliana* (Contreras-Cornejo et al., 2009; Sirrenberg et al., 2007).

Os agentes de biocontrole podem, também, promover o aumento da absorção e translocação de nutrientes, incrementando o crescimento de plantas. Plantas de pimentão tratadas com *T. harzianum* tiveram maior peso fresco de parte aérea e de raiz, maior comprimento de parte aérea, maior área foliar e aumento de 90% na concentração de fósforo e de 30% na de ferro (Yedidia et al., 2001).

A aplicação de agentes de biocontrole pode tornar as plantas mais tolerantes a estresses hídricos (Bae et al., 2009; Harman, 2000). Plantas de milho originadas de sementes tratadas com *T. harzianum* foram mais tolerantes à seca em condições de campo, provavelmente em vista do maior desenvolvimento e aprofundamento das raízes, com consequente maior absorção de água (Harman, 2000). Em mudas de cacauete tratadas com *T. hamatum* e mantidas em condições de seca, houve atraso no fechamento de estômatos (Bae et al., 2009). Em milho, a aplicação de *T. harzianum* T22 induziu o metabolismo de carboidratos e proteínas relacionadas à fotossíntese, resultando em maior teor de amido nas folhas (Shores & Harman, 2008). Este efeito pode ser

acentuado em condições de seca prolongada, que resulta em privação de carbono em vista do fechamento estomático prolongado. Os agentes de biocontrole podem, também, promover o crescimento das plantas por meio do aumento da fotossíntese (Shoresh & Harman, 2008; Shoresh, et al., 2010).

A salinidade inibe o crescimento da maioria das espécies vegetais, pois altera as relações de água nos tecidos e provoca distúrbios no equilíbrio de íons, e os efeitos podem ser reduzidos em plantas tratadas com microrganismos benéficos (Yildirim et al., 2006). Para os autores, o peso fresco de plantas de abóbora tratadas com os produtos comerciais Yield Shield (*Bacillus pumilis* GB34), SuperBio® AgBlend™ (*Bacillus* spp.), SuperBio® SoilBuilder™ (*Bacillus* spp., actinomicetos, cianobacteria, alga) foi significativamente maior que em plantas não tratadas, mantidas em ambiente salino.

Sob estresse, aumenta-se a produção de espécies reativas de oxigênio, as quais podem se acumular em níveis que podem danificar os componentes da célula, como por meio da peroxidação lipídica (Shoresh et al., 2010; Waller et al., 2005). Fungos endofíticos podem regular a produção exagerada de espécies reativas de oxigênio e reduzir os sintomas de estresse (Shoresh et al., 2010; Waller et al., 2005). Em raízes de plantas de milho em que se aplicou *Trichoderma* spp., os níveis de peroxidase e glutatona redutase, enzimas detoxificantes, foram maiores (Shoresh & Harman, 2008). Para os autores, a aplicação de agentes benéficos pode reduzir processos de oxidações indesejáveis, reduzir os sintomas de estresse, com consequente melhor desenvolvimento das plantas.

Fungos como *C. rosea* e *Trichoderma* spp. podem aumentar o desenvolvimento de raízes (Harman, 2000; Roberti et al., 2008; Shoresh & Harman, 2008; Shoresh et al., 2010; Sutton et al., 2008). Raízes mais desenvolvidas podem explorar mais o solo, aumentar a absorção de nutrientes e água e, conseqüentemente, aumentar o desenvolvimento das plantas (Harman, 2000; Shoresh et al., 2010).

A aplicação de microrganismos em sementes pode aumentar a eficiência no uso de nitrogênio (Harman, 2000; Shoresh et al., 2010). Quando cultivadas em campos com baixos teores de nitrogênio, plantas de milho em que se aplicou *T. harzianum* T22 foram maiores e mais verdes que em plantas sem aplicação (Harman, 2000). Segundo o autor, na presença de *T. harzianum* T22, o rendimento máximo de milho foi com 50% da dose necessária para rendimento máximo na ausência do fungo. A redução na

adubação nitrogenada com manutenção da produtividade é relevante, pois reduz os custos de produção e melhora a sustentabilidade dos sistemas. Os agentes de biocontrole podem ser aplicados em sementes ou mudas, o que é vantajoso, pois os microrganismos podem sobreviver e proliferar durante a estação de cultivo, o que favorece o controle de patógenos e, em alguns casos, promove o melhor desenvolvimento das plantas sem necessidade de aplicações repetidas (Bennett et al., 2009; Shores et al., 2010; Sutton et al., 2008; Xue, 2003).

2.3 *Clonostachys rosea* como agente de biocontrole

Na busca por antagonistas eficientes, vem-se enfatizando o fungo *Clonostachys rosea* (Link Fries) [forma perfeita = *Bionectria ochroleuca*], anteriormente classificado como *Gliocadium roseum* (Schroers et al., 1999). *Clonostachys rosea* é organismo cosmopolita, presente naturalmente no solo, restos culturais, plantas daninhas e cultivadas (Sutton et al., 1997). O antagonista é eficiente no controle de vários patógenos como *Botrytis cinerea*, *Alternaria radicina*, *A. dauci*, *A. alternata*, *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum* f. sp. *pisi*, *F. solani* f. sp. *pisi*, *Aphanomyces euteiches*, *Erysiphe orontii*, *Moniliophthora roreri*, *M. perniciosa*, *Phytophthora palmivora*, *Mycosphaerella pinodes*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* (Cota et al., 2008b; Jensen et al., 2004; 2000; Krauss & Soberanis, 2001; Lahoz et al., 2004; Lubeck et al., 2002; Morandi et al., 2008; Sutton et al., 1997; Xue, 2003). Os mecanismos relatados de antagonismo de *C. rosea* aos fungos fitopatogênicos citados são indução de resistência, hiperparasitismo e competição (Lahoz et al., 2004; Roberti et al., 2008; Sutton et al., 1997; Xue et al., 2003).

Aplicou-se *C. rosea* em raízes de plantas de tabaco, analisou-se o extrato foliar quanto aos níveis de β -1,3-glucanases, β -1,4-glicosidases, quitinases, N-acetil-b-dglucosaminidase, e peroxidases, e se detectou aumento na atividade de β -1,3-glucanases, β -1,4-glicosidases e quitinases. Adicionalmente, nas plantas tratadas com *C. rosea* nas raízes e, posteriormente, inoculadas com *Erysiphe orontii* nas folhas, a severidade do oídio foi menor que naquelas em que não se aplicou o antagonista (Lahoz et al., 2004). Esta foi a primeira confirmação de que *C. rosea* poderia induzir resistência em plantas.

Para verificar se *C. rosea* induziria resistência em trigo a *Fusarium culmorum*, após aplicar o antagonista nas sementes, inoculou-se o patógeno, e se avaliaram as proteínas (PR4), peroxidases e quitinases; as PR4 foram expressas mais cedo quando se aplicou o antagonista (Roberti et al., 2008). Para os autores, com a aplicação de *C. rosea*, as plantas expressaram compostos de defesa mais rapidamente, pois as proteínas PR4 estão envolvidas com atividade de ribonuclease, o que induz resistência na planta. A expressão rápida de compostos de defesa é importante pois, em alguns, casos as plantas conseguem reconhecer o patógeno e iniciar sua defesa. Porém, em certas ocasiões, o ataque é muito rápido e, quando a planta produz os compostos de defesa, a infecção já está em estado avançado, e o patógeno não é afetado (Roberti et al., 2008).

Hifas de *C. rosea* podem penetrar em conídios, escleródios e hifas de *B. cinerea* e os parasitar (Sutton et al., 1997). Morandi et al. (2001) observaram que hifas de *C. rosea* penetravam em hifas de *B. cinerea* e as estrangulavam. Sabe-se que *C. rosea* produz compostos antifúngicos e enzimas que degradam a parede de outros fungos, mas o papel dessas substâncias no parasitismo ainda não foi completamente elucidado (Sutton et al., 1997). Por meio de microscopia eletrônica de varredura, observou-se que hifas de *C. rosea* penetravam, de forma direta, em conídios e hifas de *B. cinerea*, onde promovia a ruptura e degradação das células do patógeno (Li et al., 2002).

Isolados de *C. rosea* aplicados isoladamente ou em conjunto reduziram a intensidade de doenças causadas por *Moniliophthora roreri*, *M. perniciosa* e *Phytophthora palmivora* em cacaueteiro, sendo o hiperparasitismo um importante mecanismo de antagonismo no controle desses patógenos (Krauss & Soberanis, 2001). Um isolado de *C. rosea*, transformado para expressão de “green fluorescent protein” (GFP), degradou hifas de *Pythium ultimum* (Mamarabadi et al., 2009). Para os autores, além de quitinases, outras enzimas devem estar envolvidas na hiperparasitismo.

O complexo de podridão radicular da ervilha, de difícil controle, causado pelos fungos *Alternaria alternata*, *Aphanomyces euteiches*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*, *F. solani* f. sp. *pisi*, *Mycosphaerella pinodes*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*, é o principal fator limitante à produção da cultura no Canadá. Em estudos *in vitro*, o isolado ACM941 de *C. rosea* parasitou os oito patógenos, sem haver halo de inibição entre as colônias dos patógenos e a de *C. rosea* (Xue et al., 2003). Em condições controladas, a aplicação de *C. rosea* nas sementes de ervilha aumentou a

germinação em 44% e a emergência em 22%, e reduziu a severidade da doença em 76%, redução superior à obtida com o fungicida thiram (65%) (Xue et al., 2003). Os autores observaram que, no campo, a eficiência do tratamento de sementes com *C. rosea* foi semelhante à do tratamento com thiram e consideraram que *C. rosea* também atuou por competição, pois colonizou as sementes e se estabeleceu nas raízes, provavelmente impedindo a infecção pelos patógenos.

A competição é também um mecanismo importante de antagonismo de *C. rosea* a *B. cinerea*. O antagonista é mais eficiente em colonizar os tecidos senescentes e mortos, o que contribui para reduzir o inóculo do patógeno (Sutton et al., 1997). *Clonostachys rosea* competiu com *B. cinerea* e inibiu sua esporulação em begônia, tomate, gerânio, morango e framboesa; na última, o antagonista inibiu a germinação dos conídios e a formação do apressório de *B. cinerea* (Sutton et al., 1997).

O isolado canadense PG 88-710 de *C. rosea* reduziu em mais de 99% a esporulação de *B. cinerea* em folhas de roseira, mesmo quando se inoculou o patógeno 24 h antes de aplicar o antagonista, o que comprova a habilidade competitiva de *C. rosea*, pois pode se estabelecer e reduzir a esporulação do patógeno mesmo quando este já está presente (Morandi et al., 2001). O isolado PG 88-710 competiu com *B. cinerea* e reduziu sua esporulação em morangueiro, eucalipto e roseira, em estudos realizados no Brasil (Morandi et al., 2003; 2001; Valdebenito-Sanhuenza et al., 1997; Von Stowasser & Ferreira, 1997; Tatagiba et al., 1998).

Obtiveram-se quatro isolados de *C. rosea* em condições brasileiras (NCR19/F, NCR60/F, NCR61/F, NCR62/F), os quais reduziram a esporulação de *B. cinerea* em folhas de morangueiro, roseira, eucalipto e tomateiro (Nobre et al., 2005) e colonizaram folhas de morangueiro, sob curtos ou longos períodos de molhamento foliar, o que é vantagem competitiva sobre *B. cinerea* (Cota et al., 2008a). Porém, em temperaturas abaixo de 10°C, foram pouco eficientes em colonizar tecidos e competir com *B. cinerea* (Cota et al., 2008a; Kohl et al., 1999). Em experimentos de campo (temperatura média do ar em torno de 16°C), realizados em Viçosa-MG, os quatro isolados foram eficientes no controle de *B. cinerea* em folhas, flores e frutos de morangueiro (Cota et al., 2008b). Para os autores, a aplicação semanal da mistura dos quatro isolados foi tão eficiente quanto o controle químico e, com duas aplicações semanais, obteve-se maior nível de controle e incrementos superiores a 100% da produção, o que indica que a temperatura

não limitou a atuação de *C. rosea* em condições de campo. Considera-se que o sucesso do biocontrole de *B. cinerea* por *C. rosea* em vários hospedeiros decorre do fato de o antagonista se estabelecer e competir com o patógeno na ausência de molhamento foliar, em períodos prolongados de molhamento, independente do estágio de desenvolvimento dos tecidos, ser pouco afetado pela radiação solar e possuir requerimentos de temperaturas semelhantes aos do patógeno (Cota et al., 2008a; Morandi et al., 2008; 2006; 2003; 2001).

2.4 Outros benefícios de *Clonostachys rosea*

Clonostachys rosea também é antagonista a nematóides, e pode parasitar cistos de *Heterodera* spp. e *Globodera* spp. (Sutton et al., 1997). Sob microscopia de fluorescência, visualizou-se que um isolado de *C. rosea*, transformado para expressão de GFP, foi antagonista a *Panagrellus redivivus*: os conídios do fungo aderiram-se à cutícula do nematóide, germinaram e os tubos germinativos penetraram no corpo do nematóide, que foi imobilizado e morreu (Zhang et al., 2008). Os autores também observaram a produção de micélio e esporos no corpo do nematóide, o que pode levar a novos ciclos no campo. Na Argentina, encontrou-se *C. rosea* parasitando *Oncometopia tucumana* (Hemiptera) e *Sonesimia grossa* (Cicadellidae), insetos vetores importantes de *Xylella fastidiosa*, agente causal da clorose variegada dos citros (Toledo et al., 2006).

Uma característica importante de *C. rosea* é a sua capacidade de se estabelecer endofiticamente em tecidos verdes (Lubeck et al., 2002; Morandi et al., 2001; Sutton et al., 2002; 1997). Geralmente, fungos endofíticos podem proteger mais as plantas hospedeiras de patógenos e insetos e podem melhorar a absorção de nutrientes, o que pode resultar em maior crescimento e produção (Elmi et al., 2000; Vega et al., 2008; Wicklow et al., 2005). Além de ser antagonista a fungos fitopatogênicos, insetos e nematóides e de ser endofítico em tecidos verdes, *C. rosea* pode promover o crescimento de plantas (Roberti et al., 2008; Sutton et al., 2008).

Aplicou-se *C. rosea* em sementes de cenoura e cebola durante o processo de “during drum priming”, adição controlada de água a sementes antes do plantio até o início fisiológico da germinação (Bennett & Whipps, 2008). Antes de a radícula emergir, interrompe-se o processo, e as sementes são levadas a um baixo ponto de umidade. Após oito semanas, recuperou-se o fungo em grande número de raízes e solo, o que para

os autores, foi indicativo de que *C. rosea* sobreviveu e proliferou nas raízes e solo. Aplicaram-se *Pseudomonas chlororaphis* MA342, *P. fluorescens* CHA0, *C. rosea* IK726, *T. harzianum* T22 e *T. viride* S17a em sementes de cebola e cenoura, pelo método de “during drum priming”, e se avaliaram a emergência e a massa fresca das plantas após 8 semanas de crescimento, em dois experimentos em casas de vegetação, e a emergência e produção, em ensaios de campo realizados por três anos em locais diferentes (Benett et al., 2009). Segundo os autores, em casa de vegetação, as sementes de cenoura tratadas com *C. rosea* IK726 emergiram mais rapidamente que as não tratadas, porém as plantas tratadas não tiveram maiores peso de massa fresca no campo, as aplicações dos microrganismos não resultaram em aumento de emergência nem de produção. Para cebola, a aplicação de *C. rosea* não aumentou a emergência, massa fresca e produção, nos experimentos de casas de vegetação e de campo (Bennett et al., 2009). Em alface sob cultivo hidropônico, a aplicação de *C. rosea* em diferentes concentrações na solução nutritiva não aumentou a matéria fresca da plantas (Correa et al., 2010).

Sementes de trigo foram desinfestadas superficialmente em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 5 min, lavadas em água corrente, secas em papel filtro e imersas em suspensão de *C. rosea* com 10^6 conídios.mL⁻¹ ou água estéril por 30 min (Roberti et al., 2008). Para os autores, com a aplicação de *C. rosea* houve crescimento maior e mais vigoroso das raízes, provavelmente porque *C. rosea* reduziu a atividade de fungos prejudiciais e a quantidade de compostos tóxicos, com aumento da absorção de nutrientes.

A seguir, relatam-se as observações de Sutton et al. (2008), com mini-rosas (*Rosa hybrida* L.), gerânio (*Pelargonium hortorum* X LH Bailey) e pepino (*Cucumis sativus* L.). Imergiram-se estacas de mini-rosas ‘Bianca’ e gerânio ‘Schone Helena’ em suspensão de *C. rosea* com 5×10^6 conídios.mL⁻¹ por 1 h antes do plantio, as quais foram cultivadas em vasos em casa de vegetação. As mini-rosas tratadas tiveram maior vigor, melhor coloração, menor senescência de folhas e maior produção de flores. Nas estacas de gerânio, *C. rosea* aumentou em 27% a quantidade de raízes. Aplicou-se *C. rosea* e *Pseudomonas chlororaphis* isoladamente ou em mistura, cada um na concentração final de 1×10^5 UFC.mL⁻¹ de solução nutritiva, e se colheram plantas de pepino ‘Loustik’ após 10, 13, 16 e 19 dias de aplicação. Após 19 dias, nas plantas

tratadas com *C. rosea*, *P. chlororaphis* ou ambos, a área foliar aumentou em 28, 39 e 24%, respectivamente, enquanto a matéria seca de raízes aumentou em 38, 48 e 26%, respectivamente. Em pepinos cultivados em estufa comercial, em placas de fibra de coco e irrigados por gotejamento, aplicou-se *C. rosea* ou *P. chlororaphis* (100 mL de suspensão com 10^6 UFC.mL⁻¹), aos 5, 26 e 47 dias do transplante. Com a aplicação de *C. rosea* e *P. chlororaphis* houve aumento de 11,1 e 10,5% na produção, respectivamente. Como os experimentos com rosas, gerânio e pepino transcorreram em praticamente ausência de patógenos, os autores consideram ser provável que o maior crescimento e produção das plantas foram mediados pela interação de *C. rosea* e o próprio hospedeiro, que pode ter influenciado a produção de hormônios, melhorado a sinalização e absorção de nutrientes. Portanto, Sutton et al. (2008) acreditam que *C. rosea* tem capacidade de promover crescimento de plantas.

Para se obter efeito de promoção de crescimento em plantas, as respostas não dependem apenas do agente de biocontrole usado, mas da espécie vegetal e, em alguns casos, até mesmo do cultivar (Alfano et al., 2007; Harman, 2006; Harman et al., 2008). Algumas espécies de *Trichoderma* promovem crescimento (Harman et al., 2008), enquanto outras não (Alfano et al., 2007). Isolados de *T. stromaticum* não induziram resistência ou aumentaram o crescimento de plantas de cacau, apesar de terem capacidade endofítica (De Souza et al., 2008). Plantas de milho tratadas com *T. harzianum* tiveram aumento médio na produtividade de cerca de 5%, mas houve diferenças significativas entre cultivares e, em algumas, a produtividade não aumentou ou foi reduzida (Harman, 2006). *Clonostachys rosea* melhorou o desenvolvimento e aumentou a produção de rosas e pepinos (Sutton et al., 2008), mas não aumentou a produção de cebola e cenoura (Benett et al., 2009). Portanto, a interação microrganismo-planta depende do isolado bem como da espécie vegetal. Em alguns casos, o microrganismo pode não promover o crescimento e, em outros, a planta pode não reconhecer e interagir positivamente com o microrganismo e/ou com compostos por ele produzidos. Portanto, não se podem fazer generalizações, e estudos de cada caso devem ser realizados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Desenvolveu-se esse trabalho na Unidade de Controle Biológico e em casas de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

3.1 Produção de *Clonostachys rosea*

Avaliaram-se os quatro isolados de *C. rosea*, obtidos em condições brasileiras (NCR19/F, NCR60/F, NCR61/F e NCR62/F), e selecionados pela capacidade de antagonismo a *B. cinerea* em folhas de morangueiro, tomateiro, roseira e eucalipto (Nobre et al., 2005).

Após 10 a 12 dias de cultivo em meio de batata-dextrose-ágar (BDA) a 25 ± 2 °C, sob luz branca fluorescente, fotoperíodo de 12 h ($15 \mu\text{mol. cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), os conídios foram retirados com bastão de vidro, suspensos em água destilada esterilizada e filtrados em duas camadas de gaze. Com um hemacitômetro, ajustou-se a concentração da suspensão de cada isolado para 10^7 conídios.mL⁻¹. Para obter a suspensão de conídios da mistura dos isolados, misturaram-se volumes iguais de cada suspensão.

3.2 Material vegetal

Como material propagativo (propágulos), usaram-se tubérculos, mudas e sementes, não tratados com pesticidas, de 17 espécies vegetais. As espécies vegetais foram selecionadas buscando-se obter maior diversidade de famílias botânicas e sistemas de produção. Os tubérculos foram de *Solanum tuberosum* (batateira) ‘Monalisa’; as mudas foram de *Eucalyptus grandis* (eucalipto) clone Top-810; e as sementes de: *Phaseolus vulgaris* (feijoeiro) ‘Pérola’, *Glycine max* (soja) ‘Vencedora’, *Zea mays* (milho) ‘UFV-100’, *Triticum vulgare* (trigo) linhagem VI 98053 UFV, *Cucumis melo* (meloeiro) ‘Melão Imperial 45’, *Passiflora edulis* (maracujazeiro) ‘Redondo Amarelo’, *Lycopersicon lycopersicum* (tomateiro) ‘Santa Clara’, *Capsicum annum* (pimentão) ‘Itapuã 501’, *Lactuca sativa* (alface) ‘Baba de Verão’, *Brassica oleracea* var. *botrytis* (couve-flor) ‘Piracicaba Precoce’, *Chrysanthemum coronarium* (crisântemo) ‘Dobrado Sortido’, *Chrysanthemum leucanthemum* (margarida) ‘Gigante Branca’, *Lobularia marítima* (alyssum violeta) ‘Alyssum Violeta’, *Dahlia pinnata* (dália) ‘Dobrada Sortida Anã’ e *Petunia hybrida* (petúnia) ‘Híbrida Sortida’.

Semearam-se as sementes em copos plásticos de 0,5 L, plantaram-se as mudas de eucalipto em vasos de 4 L e os tubérculos de batata em vasos de 2 L, com o substrato orgânico Topstrato[®]. As plantas permaneceram em casa de vegetação com temperatura média de 25 °C. A cada 15 dias, adubou-se, adicionando-se a cada planta 20 mL de solução com 10 g de 13-13-15 (Nutriverde[®]) por litro de água. Testaram-se as espécies vegetais em experimentos independentes, executados por uma vez para crisântemo, batateira e eucalipto e por duas vezes, para as demais espécies.

3.3 Redução do tempo de emergência

Compararam-se seis tratamentos: água (testemunha), suspensão de 10^7 conídios.mL⁻¹ de cada um dos quatro isolados de *C. rosea*, e mistura dos quatro isolados, com concentração final de 10^7 conídios.mL⁻¹. Imergiram-se os propágulos nas suspensões de conídios por 1 h antes da semeadura. Imediatamente após a semeadura, regou-se cada vaso com 20 mL da suspensão de conídios. Após a semeadura, diariamente avaliou-se a emergência das plântulas, exceto para batateira e eucalipto. Calculou-se a média de dias em que a emergência atingiu 100%, a amplitude entre as repetições e se comparou os tratamentos de forma descritiva. O experimento foi em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições (uma unidade experimental = dez propágulos).

3.4 Promoção de crescimento

Compararam-se os seis tratamentos adotados no item 3.3, cada um com três números de aplicações: 1 - imersão dos propágulos na suspensão de conídios por 1 h antes do plantio e aplicação da mesma somente no plantio; 2 - imersão dos propágulos na suspensão de conídios por 1 h antes do plantio e aplicação da mesma no plantio e 7 dias após; 3 - imersão dos propágulos na suspensão de conídios por 1 h antes do plantio e aplicação da mesma no plantio, 7 dias após e 14 dias após o plantio. Em cada aplicação, usaram-se 20 mL de cada tratamento.

Aos 35 dias do plantio (exceto para eucalipto e batata, após 103 e 53 dias, respectivamente), determinaram-se a altura (exceto para alface, batateira, couve-flor e margarida) e a matéria seca das partes aéreas e do sistema radicular de todas as espécies. Para tal, as partes aéreas foram cortadas, colocadas em sacos de papel e secas em estufa

a 60°C por 72 h. As raízes foram lavadas sob água corrente, colocadas em sacos de papel e postas em estufa a 60°C por 72 h.

O experimento foi em esquema fatorial (6 tratamentos x 3 números de aplicações) com cinco repetições (um propágulo = uma unidade experimental). Realizaram-se testes de normalidade, análise de variância e testes de média, com o Programa SAS v 9.2.

|

4 RESULTADOS

4.1 Redução do tempo de emergência

Dos dois experimentos, calcularam-se as médias conjuntas do número de dias que transcorreram até haver 100% de emergência. Para a margarida, com a aplicação do isolado NCR/61F, a redução no tempo médio foi superior a 2 dias. Para as demais combinações culturas/isolados, a redução não foi superior a 1 dia (Tabela 1).

Tabela 1. Médias (amplitude), em dias de emergência de plântulas de 15 culturas, tratadas com água (testemunha) ou com suspensão de conídios de quatro isolados de *Clonostachys rosea*, individualmente ou em mistura.

Cultura	Tratamento										
	Água		NCR19/F		NCR60/F		NCR61/F		NCR62/F		Mistura de isolados
Alface	3,83*	(3-4)	3,49	(3-4)	3,83	(3-5)	3,16	(3-4)	3,49	(3-4)	3,50 (3-5)
Alyssum violeta	4,83	(4-6)	4,83	(4-5)	5,33	(5-6)	4,83	(4-6)	4,49	(4-6)	4,49 (4-6)
Couve-flor	4,16	(4-5)	3,49	(3-4)	3,66	(3-4)	3,66	(3-4)	3,99	(3-5)	3,66 (3-4)
Crisântemo	3,33	(3-4)	4,00	(4-4)	3,66	(3-4)	4,00	(3-5)	3,66	(3-4)	4,00 (3-5)
Dália	5,83	(5-6)	5,83	(5-7)	6,50	(5-8)	6,16	(5-8)	6,33	(5-7)	6,16 (4-7)
Feijão	5,83	(4-7)	5,99	(5-7)	5,83	(5-7)	6,16	(5-7)	6,16	(6-7)	5,00 (5-5)
Maracujá	17,16	(15-19)	17,33	(15-19)	16,99	(14-19)	16,99	(15-18)	17,00	(16-18)	16,83 (15-19)
Margarida	10,50	(9-12)	8,50	(8-10)	9,66	(8-13)	7,66	(6-8)	9,16	(7-11)	9,00 (8-10)
Melão	8,99	(5-12)	8,99	(6-12)	8,99	(6-12)	9,16	(6-11)	9,33	(5-12)	9,33 (5-12)
Milho	4,50	(4-6)	4,50	(4-5)	4,50	(4-5)	4,66	(4-6)	4,50	(4-5)	4,66 (4-6)
Petúnia	7,00	(6-8)	6,33	(6-7)	6,33	(6-7)	6,49	(6-7)	6,83	(6-8)	6,99 (6-8)
Pimentão	11,83	(10-13)	11,99	(10-15)	11,33	(9-14)	11,66	(10-14)	11,99	(10-14)	11,49 (9-14)
Soja	5,16	(4-7)	5,50	(5-6)	5,16	(4-7)	5,83	(4-8)	5,16	(4-7)	5,66 (4-7)
Tomate	5,83	(5-7)	5,50	(5-7)	5,50	(5-7)	5,83	(5-7)	5,66	(5-6)	5,33 (5-6)
Trigo	3,00	(2-4)	2,83	(2-4)	3,16	(2-4)	2,99	(2-4)	2,99	(2-4)	2,83 (2-4)

* Médias de seis repetições

4.2 Promoção de crescimento

Para a matéria seca do sistema radicular de eucalipto, não houve distribuição normal dos erros experimentais, e se transformaram os dados para raiz quadrada. Para as demais culturas, houve distribuição normal dos erros. Como detectou-se homogeneidade das variâncias dos dois experimentos, efetuou-se análise conjunta dos dados de ambos.

Para as plantas de feijão, milho, trigo, pimentão, batata, alface, melão e dália não se detectou efeito significativo dos tratamentos na matéria seca de sistema radicular ($P > 0,1299$), matéria seca de parte aérea ($P > 0,0635$) e altura das plantas ($P > 0,2099$) (Tabelas 2, 3 e 4). Para plantas de maracujá, detectou-se efeito significativo de isolado em relação à altura ($P = 0,0126$), e para couve-flor, detectou-se efeito significativo de isolado em relação a matéria seca de sistema radicular ($P = 0,0415$), porém para ambas as culturas os isolados não diferiram pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) (Tabelas 2, 3 e 4).

Tabela 2. Médias da matéria seca do sistema radicular (g) de plantas de 12 culturas, tratadas com água (testemunha) ou com suspensão de conídios de quatro isolados de *Clonostachys rosea*, individualmente ou em mistura.

Cultura	Tratamentos					
	Água	NCR19/F	NCR60/F	NCR61/F	NCR62/F	Mistura de isolados
Alface	0,155*	0,184	0,18	1,699	0,164	0,166
Batata	31,444	37,083	36,667	40,091	41,455	43,364
Couve-flor	0,115	0,147	0,148	0,144	0,141	0,139
Dália	0,146	0,175	0,191	0,186	0,165	0,179
Feijão	0,32	0,278	0,27	0,286	0,258	0,293
Maracujá	0,109	0,121	0,143	0,126	0,131	0,13
Melão	0,155	0,173	0,162	0,171	0,17	0,165
Milho	0,370	0,400	0,400	0,415	0,380	0,390
Pimentão	0,101	0,107	0,103	0,111	0,109	0,107
Petúnia	0,179	0,174	0,185	0,204	0,179	0,179
Soja	0,098	0,133	0,104	0,111	0,102	0,102
Trigo	0,223	0,247	0,238	0,234	0,221	0,251

*Médias de 30 observações (5 repetições x 3 números de aplicações x 2 experimentos).

Tabela 3. Médias da matéria seca de parte aérea de plantas (g) de 12 culturas, tratadas com água (testemunha) ou com suspensão de conídios de quatro isolados de *Clonostachys rosea*, individualmente ou em mistura.

Cultura	Tratamentos					
	Água	NCR19/F	NCR60/F	NCR61/F	NCR62/F	Mistura de isolados
Alface	0,677*	0,702	0,721	0,725	0,783	0,767
Batata	2,971	3,149	3,531	3,2	3,479	3,98
Couve-flor	0,666	0,768	0,782	0,775	0,766	0,704
Dália	0,59	0,677	0,662	0,693	0,613	0,618
Eucalipto	25,367	26,654	27,647	28,629	26,567	30,629
Feijão	1,545	1,461	1,453	1,481	1,333	1,497
Maracujá	0,43	0,402	0,481	0,49	0,485	0,475
Milho	1,035	1,096	1,078	1,044	1,118	1,049
Melão	0,821	0,878	0,837	0,869	0,859	0,869
Petúnia	1,003	1,088	1,083	1,121	1,037	0,959
Pimentão	0,427	0,474	0,455	0,445	0,465	0,481
Trigo	0,424	0,435	0,433	0,46	0,469	0,485

*Médias de 30 observações (5 repetições x 3 números de aplicações x 2 experimentos).

Tabela 4. Médias de altura de plantas (cm) de 11 culturas, tratadas com água (testemunha) ou suspensão de conídios de quatro isolados de *Clonostachys rosea*, individualmente ou em mistura.

Cultura	Tratamentos					
	Água	NCR19/F	NCR60/F	NCR61/F	NCR62/F	Mistura de isolados
Crisântemo	12,433*	11,267	14,167	13,333	12,367	12,929
Dália	14,125	14,907	13,556	15,346	13,982	14,519
Eucalipto	90,533	89,461	88,867	92,786	88	91,928
Feijão	33,373	37,888	30,397	32,261	31,982	28,342
Maracujá	8,018	8,288	8,643	8,865	9,133	9,000
Melão	13,000	14,307	13,327	14,000	13,327	14,000
Milho	18,845	19,917	20,1	19,5	20,379	19,38
Pimentão	15,933	17,16	16,589	16,55	16,815	16,981
Soja	15,583	16,569	15,879	16,000	15,965	15,807
Tomate	18,333	19,933	19,879	20,569	19,65	20,257
Trigo	16,569	17,138	16,981	18,067	17,732	17,586

*Médias de 30 observações (5 repetições x 3 números de aplicações x 2 experimentos).

Detectou-se efeito significativo de isolados para matéria seca de parte aérea de plantas de tomate ($P = 0,0132$), margarida ($P = 0,0304$) e soja ($P = 0,0076$); matéria seca do sistema radicular de plantas de tomate ($P < 0,0001$), margarida ($P < 0,0001$) e

eucalipto ($P = 0,0037$); e para altura de plantas de petúnia ($P = 0,0051$) e alyssum violeta ($P = 0,0044$) (Figura1). De maneira geral, a aplicação da mistura de isolados não foi mais eficiente que a aplicação individual.

|

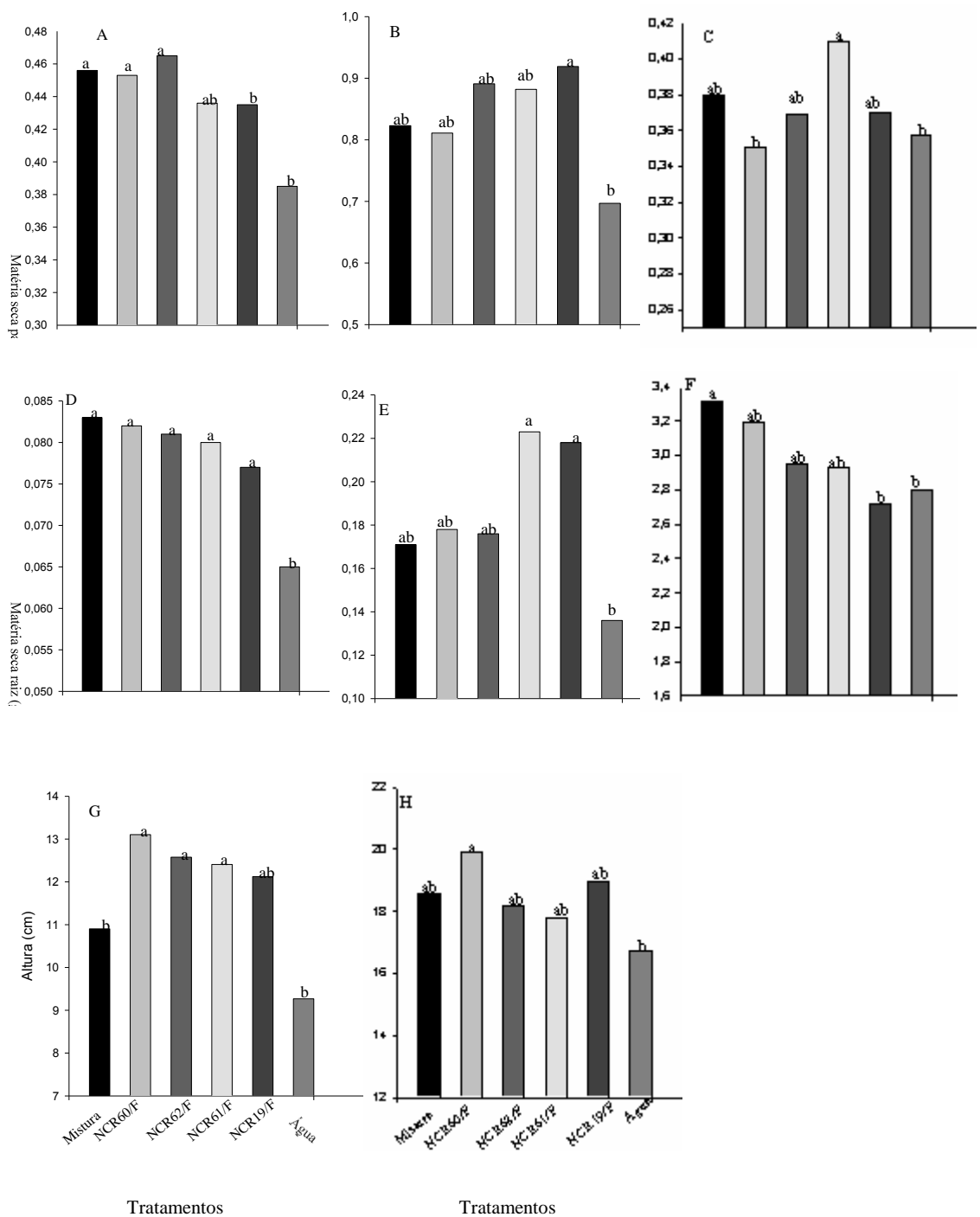


Figura 1. Matéria seca da parte aérea de plantas de tomate (A), margarida (B) e soja (C); matéria seca do sistema radicular de plantas de tomate (D), margarida (E) e eucalipto (F); e altura de plantas de petúnia (G) e alyssum violeta (H); tratadas com suspensão de conídios de *Clonostachys rosea*, individualmente ou em mistura, ou com água (testemunha). Barras seguidas da mesma letra não diferem (Teste de Tukey, $\alpha = 0,05$).

Detectou-se efeito significativo da interação isolado - número de aplicações para a matéria seca da parte aérea de plantas de alyssum violeta ($p=0,0198$) e de crisântemo ($p=0,0332$), bem como de matéria seca do sistema radicular de plantas de alyssum violeta ($<0,0001$) e de crisântemo ($p=0,0335$) (Tabela 5).

Tabela 5: Matérias secas da parte aérea e do sistema radicular de plantas de *alyssum violeta* e *crisântemo*, tratadas com água (testemunha) ou com suspensão de conídios de *Clostrachys rosea*, em indivíduo alente ou em mistura. Médias de dois experimentos.

Cultura	Matéria número de seca (g) aplicações*	Tratamento								
		Água	NCR.19/F	NCR.60/F	NCR.61/F	NCR.62/F	Mistura de isolados			
Alyssum violeta	Sistema	1	0,039Ab*	0,046ABab	0,034Bb	0,052Aa	0,041Aab	0,044Aab		
	radicular	2	0,034Ab	0,038Bab	0,053Aa	0,044ABab	0,049Aa	0,048Aab		
		3	0,03Ac	0,057Aa	0,047Aab	0,040Bbc	0,039Abc	0,038Ac		
Parte aérea	1	1	0,158Ab	0,222Aa	0,204Bab	0,202Aab	0,250Aa	0,203Aab		
		2	0,176Ab	0,198Aab	0,247Aa	0,221Aab	0,239Aa	0,221Aab		
	3	0,197Aa	0,245Aa	0,227Aba	0,204Aa	0,205Aa	0,239Aa			
Crisântemo	Sistema radicular	1	0,200Aa	0,276Aa	0,303Aa	0,306Aa	0,191Aa	0,195Aa		
		2	0,187Aa	0,256Aa	0,256Aa	0,260ABa	0,259Aa	0,268Aa		
	3	0,229Aa	0,173Aa	0,256Aa	0,168Ba	0,272Aa	0,202Aa			
Parte aérea	1	1	0,969Aa	1,112Aa	1,307Aa	1,393Aa	0,912Aa	1,018Aa		
		2	1,039Aa	1,122Aa	1,112Aa	1,237ABa	0,937Aa	1,224Aa		
	3	1,323Aa	0,764Aa	1,318Aa	0,978Ba	1,173Aa	0,978Aa			

* 1 = no plantio; 2 = no plantio e 7 dias após, 3 = no plantio, 7 e 14 dias após.

** Para cada cultura e tipo de matéria seca, as médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem (teste de Tukey, $\alpha=0,05$).

De maneira geral, com a reaplicação dos isolados não houve aumento da matéria seca, exceto para os isolados NCR19/F, NCR60/F e NCR62/F em alyssum violeta, para a matéria seca do sistema radicular, e para o isolado NCR61/F em crisântemo, para as matérias secas do sistema radicular e de parte aérea.

Quanto ao número de aplicações, não se detectou efeito significativo para todas as variáveis analisadas, em qualquer cultura ($P > 0,0725$).

5 DISCUSSÃO

Microrganismos antagonistas, além de controlarem patógenos, podem promover o crescimento de plantas. Esse efeito pode ser por reduzir o tempo de emergência (Bennett et al., 2009), aumentar a altura (Hamayun et al., 2009; Yedidia et al., 2001) e/ou aumentar a massa de tecido vegetal (Sutton et al., 2008; Yedidia et al., 2001). Nessa perspectiva, avaliaram-se os quatro isolados de *C. rosea*, sabidamente eficientes no biocontrole de *B. cinerea* (Cota et al., 2009; 2008b), quanto à promoção de crescimento de plantas de 17 espécies vegetais.

A aplicação de *C. rosea* reduziu o tempo médio de emergência em margarida, e a redução foi maior que 2 dias com o isolado NCR61/F. Ocorreu fato similar com sementes de cenoura, mantidas em casa de vegetação, tratadas com *C. rosea* IK 726 (Bennett et al., 2009). Nas plantas das demais espécies não ocorreu redução no tempo de emergência, fato também observado com sementes de cebola tratadas com *C. rosea* IK 726 (Bennett et al., 2009). A velocidade de emergência parece ser uma característica intrínseca das sementes, sendo mais influenciada pelo vigor das mesmas que pela aplicação de microrganismos. Assim, para a maioria das culturas avaliadas, em vista do alto vigor das sementes, o tempo de emergência foi uniforme e insuficiente para que *C. rosea* atuasse ou que se detectasse seu efeito. Provavelmente, esse efeito pudesse ocorrer em presença de estresse(s). Quando aplicado em sementes de ervilha na presença de *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*, *F. solani* f. sp. *pisi*, *Mycosphaerella pinodes*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*, *C. rosea* ACM 941 aumentou a emergência, o que foi atribuído ao antagonismo de *C. rosea* aos patógenos (Xue et al., 2003). Os presentes experimentos transcorreram na ausência de fitopatógenos. Em sistemas de produção comercial, onde é comum ocorrerem patógenos de sementes e plântulas, a aplicação de *C. rosea* poderá aumentar a emergência, principalmente em vista da capacidade antagonista do fungo. É interessante ressaltar que, para margarida, com o isolado NCR/61F, além de haver maior velocidade de emergência, houve maior média de matéria seca do sistema radicular.

Para as plantas de tomate, margarida, eucalipto e soja, os isolados promoveram o aumento das matérias secas da parte aérea e do sistema radicular e, para petúnia e alyssum violeta, o aumento da altura de plantas. Esse aumento ocorreu, em petúnia, com

a aplicação dos isolados NCR60/F, NCR61/F e NCR62/F e, em alyssum violeta, com o isolado NCR60/F. Independentemente dos isolados de *C. rosea*, ocorreu aumento de matéria seca em tomate, margarida, eucalipto e soja. Assim, em geral, não houve especificidade de isolados de *C. rosea* e espécies vegetais quanto à promoção do crescimento, pois em espécies de famílias botânicas distintas (Solanaceae, Asteraceae, Myrtaceae, Leguminosae e Brassicaceae) ocorreu a promoção. Ocorreu diferença de efeito entre os isolados, pois o NCR61/F promoveu o crescimento de plantas de quatro espécies vegetais. A aplicação da mistura de isolados não foi mais efetiva em promover o crescimento, pois foi eficiente apenas em tomate e eucalipto, enquanto a aplicação do isolado NCR61/F foi eficiente em plantas de tomate, margarida, soja e petúnia. A falta de especificidade de *C. rosea* em promover o crescimento já havia sido observada (Sutton et al., 2008). Os autores detectaram a promoção em mini-rosas, gerânio e pepino, inclusive com incrementos de quantidade e qualidade na produção. Por outro lado *C. rosea* não promoveu o crescimento em cebola, cenoura e alface (Bennett et al., 2009; Correa et al., 2010). Demanda-se avaliar o efeito dos quatro isolados de *C. rosea* em outras espécies vegetais para, possivelmente, ampliar seu espectro de ação.

Em plantas de alface, batata, couve-flor, dália, melão, milho e pimentão, a aplicação de *C. rosea* não aumentou significativamente a altura nem as matérias secas do sistema radicular e da parte aérea, apesar de as médias das variáveis serem maiores com a aplicação. É possível que a tendência de aumento do crescimento dessas plantas acentue-se em condições de produção comercial. Nos experimentos aqui conduzidos, as condições de cultivo como temperatura, umidade e nutrição permaneceram ideais. Na produção comercial, essas condições podem não ser ideais e as plantas sofrerem estresses, com conseqüente redução de crescimento. Aplicações de agentes de biocontrole podem reduzir os efeitos de estresses e fazer com que as plantas mantenham sua capacidade produtiva (Bae et al., 2009; Harman, 2000; Shores et al., 2010; Shores & Harman, 2008). Em condições de campo, plantas de milho oriundas de sementes tratadas com *T. harzianum* toleraram mais a seca provavelmente em vista do maior desenvolvimento e aprofundamento das raízes, com conseqüente maior absorção de água (Harman, 2000). Nos experimentos aqui conduzidos, cultivaram-se as plantas em condições controladas, e a avaliação foi na fase de mudas. Caso se postergasse a avaliação, com maior período para *C. rosea* atuar, possivelmente o efeito de promoção

fosse mais pronunciado. É provável que esse efeito seja mais visível em condições de produção comercial, onde há maior desenvolvimento das raízes, as plantas exploram maior volume de solo e absorvem mais água, ficando menos expostas a condição de estresse hídrico, como já relatado (Harman, 2000). No experimento atual, usou-se a dose recomendada de nitrogênio. Como a aplicação de microrganismos em sementes pode aumentar a eficiência no uso de nitrogênio (Harman, 2000, Shores et al., 2010), é possível que *C. rosea* também aumente a eficiência do uso desse e de outros nutrientes. Assim, demanda-se efetuar novos experimentos, em que se avalie a aplicação de *C. rosea* com doses diferenciadas de nutrientes.

Nas plantas de tomate, margarida, eucalipto, soja, petúnia e alyssum violeta, com uma aplicação de *C. rosea* obteve-se promoção de crescimento, que não aumentou com o aumento no número de aplicações. Nessas plantas, é provável que *C. rosea* tenha se estabelecido no substrato, pois é fungo encontrado naturalmente no solo (Sutton et al., 1997); na superfície de raízes, pois pode sobreviver por longos períodos na rizosfera, onde se multiplica (Bennett et al., 2008; Xue et al., 2003); e/ou se estabelecido como endofítico, como ocorreu em raízes de cevada e tecidos verdes de roseira e tomateiro (Lubeck et al., 2002; Morandi et al., 2001; Sutton et al., 2002; 1997). A aplicação de antagonistas em sementes antes da semeadura é vantajosa, pois tem menor custo e maior praticidade, mas é vital que o agente se estabeleça, o que evitaria aplicações repetidas. As observações transcorreram em um período curto, fase de mudas, e se cultivaram as plantas em condições controladas de casa de vegetação. Em condições de produção comercial, em que há maior variação das variáveis ambientais, maior competição com microrganismos e as plantas permanecem por períodos longos até produzirem, é fundamental que se reavalie o número de aplicações e o estabelecimento de *C. rosea*. Como o ambiente pode ser desfavorável em condições comerciais, *C. rosea* pode não permanecer ativo em quantidade suficiente para que ocorram os benefícios advindos da sua aplicação. O crescimento micelial e a colonização de tecidos pelos isolados de *C. rosea* aqui avaliados são afetados pela temperatura, que é ótima a 25°C e limitante se abaixo de 10°C (Cota et al., 2008a). Na casa de vegetação onde se cultivaram as plantas, a temperatura permaneceu a 25 ± 2°C, o que favoreceu o estabelecimento dos isolados.

Ainda não conhecem os mecanismos bioquímicos e genéticos associados à promoção do crescimento de plantas por *C. rosea*. Agentes de biocontrole podem

promover o crescimento por melhorar as condições fisiológicas, reduzir estresses abióticos, aumentar a eficiência fotossintética e assimilação de nutrientes, ou por produzir reguladores de crescimento (Bennett et al., 2009; Contreras-Cornejo et al., 2009; Dai et al., 2008; Gravel et al., 2007; Hamayun et al., 2009; Shores et al., 2010; Sirrenberg et al., 2007; Sutton et al., 2008; Yedidia et al., 2001). É possível que a promoção do crescimento por *C. rosea* seja mediada pela produção de hormônios vegetais, o que explica a baixa especificidade do fungo, pois os hormônios atuam em plantas de várias espécies. Porém, a quantidade de hormônio produzida/induzida por um isolado pode variar, o que alteraria a eficiência do isolado em promover o crescimento. A aparente falta de especificidade de *C. rosea* em promover o crescimento, independente da espécie vegetal, potencializa o uso do fungo para várias culturas.

O aumento na absorção e/ou eficiência de uso de nutrientes é outro possível mecanismo pelo qual *C. rosea* promoveu o crescimento de plantas. Aplicações de *T. harzianum* promoveram crescimento de plantas de pimentão, com aumento nas concentrações de fósforo e ferro em tecidos foliares (Yedidia et al., 2001), e aumentaram a eficiência no uso de nitrogênio em plantas de milho (Harman, 2000). Assim, é possível que *C. rosea* aumente a absorção e/ou eficiência de uso de nutrientes. No presente experimento, não se analisaram os nutrientes foliares e não se variaram doses de nutrientes, o que deve ser avaliado em experimentos futuros, para ajudar a elucidar os mecanismos de promoção de crescimento por *C. rosea*. Microrganismos também podem aumentar o crescimento de plantas pela redução de formas reativas de oxigênio, produzidas principalmente em condições de estresse (Shores et al., 2010; Shores & Harman, 2008; Waller et al., 2005). Como é possível que *C. rosea* também reduza processos de oxidação, a promoção de crescimento mediada pelo fungo tenda a se acentuar em condições de produção comercial, onde estresses são mais frequentes, em vista do aumento de espécies reativas de oxigênio e processos indesejáveis de oxidação. Novamente, reforça-se a necessidade de experimentos posteriores em condições de produção comercial.

Com os resultados obtidos, não se podem tecer generalizações sobre o uso de *C. rosea* como promotor do crescimento de plantas. Tais generalizações sobre o uso de microrganismos antagonistas na promoção do crescimento de plantas são difíceis. Em alguns casos, o microrganismo pode não promover o crescimento e, em outros, a planta

pode não reconhecer e interagir positivamente com o microrganismo e/ou com compostos por ele produzidos (Alfano et al., 2007; Harman, 2006; Harman et al., 2008). Algumas espécies de *Trichoderma* promovem crescimento (Harman et al., 2008), outras não (Alfano et al., 2007). Isolados de *T. stromaticum* não induziram resistência ou aumentaram o crescimento apesar da sua capacidade endofítica (De Souza et al., 2008). Houve aumento da produtividade de plantas de milho tratadas com *T. harzianum*, com diferenças significativas entre cultivares: em algumas, a produtividade não aumentou ou reduziu (Harman, 2006). *Clonostachys rosea* melhorou o desenvolvimento e aumentou a produção de rosas e pepinos (Sutton et al., 2008), mas não aumentou a produção de cebola e cenoura (Benett et al., 2009). Assim, demandam-se estudos que avaliem a promoção de crescimento pelos isolados de *C. rosea* em situações distintas.

Não se conhece qualquer estudo em que se avaliou o potencial dos quatro isolados brasileiros de *C. rosea* em promover o crescimento de plantas. Com o presente estudo, comprovou-se a capacidade de os isolados brasileiros de *C. rosea* em promover o crescimento de diferentes espécies vegetais (tomate, margarida, soja, eucalipto, petúnia e alyssum violeta). O isolado NCR61/F destacou-se por reduzir o tempo de emergência em margarida e promover o crescimento de plantas de quatro espécies vegetais. Não se estudaram os mecanismos pelos quais *C. rosea* promove o crescimento de plantas, e é importante conduzir estudos futuros para elucidar esses mecanismos, bem como para avaliar a aplicação de *C. rosea* em condições de produção comercial. De qualquer forma, os resultados obtidos foram inéditos, importantes e estimuladores para que se continuem os trabalhos nessa linha de investigação científica. Em se obtendo sucesso, antevê-se o uso de *C. rosea* no contexto de manejo integrado de doenças.

6 CONCLUSÕES

Com o presente trabalho concluiu-se que:

- em margarida, a aplicação do isolado NCR61/F de *C. rosea* reduziu o tempo médio de emergência de plântulas;
- a aplicação de *C. rosea* promoveu o crescimento de plantas de tomate, margarida, eucalipto, soja, petúnia e alyssum violeta;
- não se detectou especificidade entre os isolados de *C. rosea* e espécie vegetal;
- o isolado NCR61/F promoveu o crescimento em maior número de espécies vegetais; e
- maior número de aplicações de *C. rosea* não resultou em maior promoção de crescimento.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alfano, G., Ivey, M.L.L., Cakir, C., Bos, J.I.B., Miller, S.A., Madden, L.V., Kamoun, S., Hoitink, H.A.J., 2007. Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma hamatum* 382. *Phytopathology* 97, 429-437.

Bae, H., Sicher, R.C., Kim, M.S., Kim, S.H., Strem, M.D., Melnick, R.L., Bailey, B.A., 2009. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botany* 60, 3279-3295.

Bennett, A.J., Mead, A., Whipps, J.M., 2009. Performance of carrot and onion seed primed with beneficial microorganisms in glasshouse and field trials. *Biological Control* 51, 417-426.

Bennett, A.J., Whipps, J.M., 2008. Dual application of beneficial microorganisms to seed during drum priming. *Applied Soil Ecology* 38, 83-89.

Contreras-Cornejo, H.A., Macias-Rodriguez, L., Cortes-Penagos, C., Lopez-Bucio, J., 2009. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 149, 1579-1592.

Correa, E.B., Bettiol, W., Morandi, M.A.B., 2010. Biological control of *Pythium aphanidermatum* root rot and growth promotion of hydroponic lettuce by *Clonostachys rosea*. *Tropical Plant Pathology* 35, 248-252.

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.

Dai, C.C., Yu, B.Y., Li, X., 2008. Screening of endophytic fungi that promote the growth of *Euphorbia pekinensis*. African Journal of Biotechnology 7, 3505-3510.

De Souza, J.T., Bailey, B.A., Pomella, A.W.V., Erbe, E.F., Murphy, C.A., Bae, H., Hebbar, P.K., 2008. Colonization of cacao seedlings by *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the witches' broom pathogen, and its influence on plant growth and resistance. Biological Control 46, 36-45.

Elad, Y., Evensen, K., 1995. Physiological aspects of resistance to *Botrytis cinerea*. Phytopathology 85, 637-43.

Elad, Y., Kirshner, B., 1993. Survival in the phylloplane of an introduced biocontrol agent (*Trichoderma harzianum*) and populations of the plant pathogen *Botrytis cinerea* as modified by abiotic conditions. Phytoparasitica 21, 303-313.

Elad, Y., 1994. Biological control of grape grey mould by *Trichoderma harzianum*. Crop Protection 13, 35-38.

Elmi, A.A., West, C.P., Robbins, R.T., Kirkpatrick, T.L., 2000. Endophyte effects on reproduction of a root-knot nematode (*Meloidogyne marylandi*) and osmotic adjustment in tall fescue. Grass and Forage Science 55, 166-172.

Fravel, D.R., 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. Annual Review of Phytopathology 43, 337-359.

Gravel, V., Antoun, H., Tweddell, R.J., 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). Soil Biology & Biochemistry 39, 1968-1977.

Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., Fisher, K. H., Dinooor, A., 2002. Improving biological control by combining agents each with several mechanisms of disease suppression. Phytopathology 92, 976-985.

Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., Dinooor, A., 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. Phytopathology 91, 621-627.

Hamayun, M., Khan, S., Ahmad, N., Tang, D.S., Kang, S.M., Na, C.I., Sohn, E.Y., Hwang, Y.H., Shin, D.H., Lee, B.H., Kim, J.G., Lee, I.J., 2009. *Cladosporium sphaerospermum* as a new plant growth-promoting endophyte from the roots of *Glycine max* (L.) Merr. World Journal of Microbiology & Biotechnology 25, 627-632.

Harman, G.E., 2000. Myths and dogmas of biocontrol - Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease 84, 377-393.

Harman, G.E., 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology 96, 190-194.

Harman, G.E., Bjorkman, T., Ondik, K., Shores, M., 2008. Changing paradigms on the mode of action and uses of *Trichoderma* spp. for biocontrol. Outlooks on Pest Management 19, 24-29.

Jackson, A. J., Walters, D. R., Marshall, G., 1994. Evaluation of *Penicillium chrisogenum* and its antifungal extracts as potential biological control agents against *Botrytis fabae* on faba beans. Mycological Research 98, 1117-126.

Jensen, B., Knudsen, I.M.B., Jensen, D.F., 2000. Biological seed treatment of cereals with fresh and long-term stored formulations of *Clonostachys rosea*: Biocontrol efficacy against *Fusarium culmorum*. European Journal of Plant Pathology 106, 233-242.

Jensen, B., Knudsen, I.M.B., Madsen, M., Jensen, D.F., 2004. Biopriming of infected carrot seed with an antagonist, *Clonostachys rosea*, selected for control of seedborne *Alternaria* spp. Phytopathology 94, 551-560.

Kohl, J., Gerlagh, M., De Haas, B. H., Krijger, M. C., 1998. Biological control of *Botrytis cinerea* in cyclamen with *Ulocladium atrum* and *Gliocladium roseum* under commercial growing conditions. Phytopathology 88, 568-575.

Kohl, J., Lomabers-van der Plas, C.H., Molhoek, W.M.L., Kessel, G.J.T., Goossen-Van Der Geijn, H.M., 1999. Competitive ability of the antagonists *Ulocladium atrum* and *Gliocladium roseum* at temperatures favorable for *Botrytis* spp. development. Biocontrol 44, 329-346.

Krauss, U., Soberanis, W., 2001. Biocontrol of cocoa pod diseases with mycoparasite mixtures. Biological Control 22, 149-158.

Lahoz, E., Contillo, R., Porrone, F., 2004. Induction of systemic resistance to *Erysiphe orontii* cast in tobacco by application on roots of an isolate of *Gliocladium roseum* Bainier. *Journal of Phytopathology* 152, 465-470.

Li, G.Q., Huang, H.C., Kokko, E.G., Acharya, S.N., 2002. Ultrastructural study of mycoparasitism of *Gliocladium roseum* on *Botrytis cinerea*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 43, 211-218.

Lubeck, M., Knudsen, I.M.B., Jensen, B., Thrane, U., Janvier, C., Jensen, D.F., 2002. GUS and GFP transformation of the biocontrol strain *Clonostachys rosea* IK726 and the use of these marker genes in ecological studies. *Mycological Research* 106, 815-826.

Mercier, J., Wilson, C. L., 1994. Colonization of apple wounds by naturally occurring microflora and introduced *Candida oleophila* and their effect on infection by *Botrytis cinerea* during storage. *Biological Control* 4, 138-144.

Mamarabadi, M., Jensen, D.F., Lubeck, M., 2009. An N-acetyl-b-D-glucosaminidase gene, *cr-nag1*, from the biocontrol agent *Clonostachys rosea* is up-regulated in antagonistic interactions with *Fusarium culmorum*. *Mycological Research* 113, 33-43.

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., Mizubuti, E.S.G., Alfenas, A.C., Barbosa, J.G., Cruz, C.D., 2006. Relationships of microclimatic variables to colonization of rose debris by *Botrytis cinerea* and the biocontrol agent *Clonostachys rosea*. *Biocontrol Science and Technology* 16, 619-630.

Morandi, M.A.B., Bettiol, W., 2009. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: Morandi, M.A.B., Bettiol, W. (eds) *Biocontrole de doenças de plantas: Uso e Perspectivas*. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, SP. pp. 7-14.

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.

Moyano, C., Raposo, R., Gomez, V., Melgarejo, P., 2003. Integrated *Botrytis cinerea* management in southeastern Spanish greenhouses. *Journal of Phytopathology* 151, 80-85.

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.

Peng, G., Sutton, J.C., 1991. Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. *Canadian Journal of Plant Pathology* 13, 247-257.

Pertot, I., Zasso, R., Amsalem, L., Baldessari, M., Angeli, G., Elad, Y., 2008. Integrating biocontrol agents in strawberry powdery mildew control strategies in high tunnel growing systems. *Crop Protection* 27, 622-631.

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.

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. *Mycologia* 91, 365-385.

Shoresh, M., Harman, G.E., 2008. The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: A proteomic approach. *Plant Physiology* 147, 2147-2163.

Shoresh, M., Harman, G.E., Mastouri, F., 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology* 48, 1-23.

Shtienberg, D., Elad, Y., 1997. Incorporation of weather forecasting in integrated, biological-chemical management of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 87, 332-340.

Sirrenberg, A., Goebel, C., Grond, S., Czempinski, N., Ratzinger, A., Karlovsky, P., Santos, P., Feussner, I., Pawlowski, K., 2007. *Piriformospora indica* affects plant growth by auxin production. *Physiologia Plantarum* 131, 581-589.

Sutton, J.C., Li, D.W., Peng, G., Yu, H., Zhang, P., ValdebenitoSanhueza, 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-Going, 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., Liu, W., Ma, J., Brown, W., G., Stewart, J.F., G.D., W., 2008. Evaluation of the fungal endophyte *Clonostachys rosea* as an inoculant to enhance growth, fitness and productivity of crop plants. *Acta Horticulturae* 782, 279-286.

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.

Toledo, A.V., Virla, E., Humber, R.A., Paradell, S.L., Lastra, C.C.L., 2006. First record of *Clonostachys rosea* (Ascomycota : Hypocreales) as an entomopathogenic fungus of *Oncometopia tucumana* and *Sonesimia grossa* (Hemiptera : Cicadellidae) in Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology* 92, 7-10.

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.

Vega, F.E., Posada, F., Aime, M.C., Pava-Ripoll, M., Infante, F., Rehner, S.A., 2008. Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control* 46, 72-82.

Von Stowasser, E.S., Ferreira, F.A., 1997. Avaliação de fungos para biocontrole de *Botrytis cinerea* em viveiros suspensos de Eucalipto. *Revista Árvore* 21, 147-153.

Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Huckelhoven, R., Neumann, C., von Wettstein, D., Franken, P., Kogel, K.H., 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance,

disease resistance, and higher yield. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, 13386-13391.

Wicklow, D.T., Roth, S., Deyrup, S.T., Gloer, J.B., 2005. A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. Mycological Research 109, 610-618.

Xue, A.G., 2003. Biological control of pathogens causing root rot complex in field pea using *Clonostachys rosea* strain ACM941. Phytopathology 93, 329-335.

Yedidia, I., Srivastva, A.K., Kapulnik, Y., Chet, I., 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. Plant and Soil 235, 235-242.

Yildirim, E., Taylor, A.G., Spittler, T.D., 2006. Ameliorative effects of biological treatments on growth of squash plants under salt stress. Scientia Horticulturae 111, 1-6.

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, 851-859.

Yourman, L. F., Jeffers, S. N., Dean, R. A., 2001. Phenotype instability in *Botrytis cinerea* in the absence of Benzimidazole and Dicarboximide fungicides. Phytopathology 91, 307-315.

Zhang, L., Yang, J.K., Niu, Q.J., Zhao, X.N., Ye, F.P., Liang, L.M., Zhang, K.Q., 2008. Investigation on the infection mechanism of the fungus *Clonostachys rosea* against nematodes using the green fluorescent protein. Applied Microbiology and Biotechnology 78, 983-990.