

RODRIGO MOREIRA SARAIVA

PRODUÇÃO MASSAL DE *Clonostachys rosea*.

Dissertação apresentada á
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

2009

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

T

S243p
2009

Saraiva, Rodrigo Moreira, 1981-
Produção massal de *Clonostachys rosea* / Rodrigo
Moreira Saraiva. – Viçosa, MG, 2009.
vii, 45f.: il. ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Luiz Antonio Maffia.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 31-37.

1. *Clonostachys rosea*. 2. Controle biológico. 3. Fungos.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 579.55

RODRIGO MOREIRA SARAIVA

PRODUÇÃO MASSAL DE *Clonostachys rosea*.

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

APROVADA: 17 de fevereiro de 2009.

Prof. Eduardo S. G. Mizubuti
(Coorientador)

Prof. Robert Weingart Barreto
(Coorientador)

Dr. Hudson Teixeira

Dr. Bruno Sérgio Vieira

Prof. Luiz Antonio Maffia
(Orientador)

OFEREÇO

á Juliana R. A. Cabral, pela presença e carinho.

DEDICO

á minha família.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida...

À minha família, em especial a minha mãe, Terezinha, pelo apoio, carinho, incentivo e ajuda nos momentos difíceis, ao meu irmão, Bruno, que apesar das brigas, sempre foi meu espelho pela sua força de vontade, à minha avó, Dona Amélia, por ajudar na minha formação e ao meu filho, Cauã, fonte de minha dedicação...

À Juliana, pelo companheirismo, amizade, carinho, apoio e ajuda no meu crescimento profissional e pessoal...

À Universidade Federal de Viçosa, à CAPES, à CNPq e à FAPEMIG, pelas oportunidades e ao apoio financeiro...

Ao professor Maffia, pelos ensinamentos, pela paciência, oportunidade e confiança em meu trabalho. Pelas conversas e conselhos durante o mestrado e iniciação científica...

Aos Coorientadores, pela amizade e a grande ajuda no desenvolvimento da dissertação...

Aos professores do departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos, amizade e pela contribuição em minha formação...

Aos professores da UFV, por alguma forma terem contribuído com minha formação...

Aos amigos do departamento, em especial ao pessoal do laboratório de Epidemiologia, pela amizade, momentos de descontração e ajuda...

Ao colega de laboratório e amigo Luciano, pelos ensinamentos, pelas conversas, repreensões, conselhos, amizade e momentos de descontração...

Aos Funcionários do DPF, pela ajuda...

Aos meus amigos de Viçosa e da UFV, em especial aos amigos dos Invorvidos e Invorvidetes, pela amizade e pelos momentos especiais durante esta caminhada...

Ao casal Adilsom e Celina, pela amizade, carinho e por me proporcionarem momentos inesquecíveis...

À todos outros amigos, familiares e professores, que direta ou indiretamente contribuíram pela realização deste trabalho...

Muito Obrigado, pois sem vocês a caminhada teria sido mais árdua!

Rodrigo Moreira Saraiva.

BIOGRAFIA

RODRIGO MOREIRA SARAIVA, filho de José Felix Saraiva e Terezinha de Jesus Moreira Saraiva, nasceu em 02 de julho de 1981 em São Paulo – SP.

Em 2001, ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde se graduou em outubro de 2006.

Em Março de 2007, iniciou o curso de mestrado em Fitopatologia na mesma instituição, defendendo a dissertação em fevereiro de 2009.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	3
<i>Botrytis cinerea</i>	3
Controle Biológico	4
<i>Clonostachys rosea</i>	5
Produção Massal de Antagonistas	8
Formulação	10
3. Material e métodos	13
Condições gerais dos experimentos	13
3.1 Substratos para a produção massal	14
3.2 Tempo de colonização e influência da secagem do substrato na produção de esporos	14
3.3 Suplementação do substrato básico	15
3.4 Influência da concentração inicial de esporos na produção massal	15
3.5 Produção de esporos em diferentes recipientes	16
3.6 Influência do fotoperíodo na produção de esporos	16
3.7 Viabilidade de esporos em formulação	16
3.8 Sobrevivência de esporos em substrato triturado	17
3.9 Colonização de folhas de eucalipto por <i>Clonostachys rosea</i>	18
3.10 Análise dos dados	19
4. Resultados	20
4.1 Substratos para a produção massal	20
4.2 Tempo de colonização e influência da secagem do substrato na produção de esporos	20
4.3 Suplementação do substrato básico	21
4.4 Influência da concentração inicial de esporos na produção massal	21
4.5 Produção de esporos em diferentes recipientes	22
4.6 Influência do fotoperíodo na produção de esporos	22
4.7 Viabilidade de esporos em formulação	22
4.8 Viabilidade de esporos em substrato triturado	23
4.9 Colonização de folhas de eucalipto por <i>Clonostachys rosea</i>	23
5. Discussão	23
6. Conclusões	30
7. Referências bibliográficas	31

RESUMO

SARAIVA, Rodrigo Moreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2009. **Produção massal de *Clonostachys rosea***. Orientador: Luiz Antonio Maffia. CoOrientadores: Eduardo S. G. Mizubuti e Robert Weingart Barreto.

O biocontrole do mofo cinzento em condições de campo é viável, este fato é comprovado pelo acúmulo de informações quanto ao antagonismo de *C. rosea* a *B. cinerea*. Porém, demanda-se otimizar a produção massal do antagonista, bem como obter formulação de baixo custo e estável no tempo. Nesse trabalho, objetivou-se desenvolver metodologia para produzir *C. rosea*. Avaliaram-se diferentes substratos, a otimização da produção, o tempo ótimo de produção, a suplementação do substrato, a concentração do inóculo inicial, a produção de esporos na ausência de luz e a produção de esporos em diferentes recipientes. Milheto, palha de soja e palha de feijão foram substratos eficientes na produção, que foi afetada pelo nível de umidade em cada substrato. A adição de suco de vegetal (V8®) aumentou a esporulação em substrato arroz. Abrindo-se o recipiente após 6 dias de colonização, antecipou-se o tempo do início da coleta e maior produção de esporos. A faixa de concentração inicial testada (10^3 a 10^8) não afetou a produção final de esporos. Não houve diferença significativa entre a produção de esporos na ausência de luz e com fotoperíodo de 12 h, aos 30 dias de colonização. Avaliou-se, ainda, a sobrevivência de esporos de *C. rosea*, armazenados a 4°C ou temperatura ambiente após diferentes tempos de secagem (12, 24, 36 e 48 h) com dois diluentes (água e sacarose 35%). Também se avaliou a sobrevivência dos esporos em substrato moído, com ou sem Caolin, armazenados a 4°C ou temperatura ambiente. Após 4 meses, avaliou-se a capacidade destes esporos em colonizar folhas de eucalipto. A germinação dos esporos submetidos a diferentes tempo de secagem reduziu-se a zero após dois meses de avaliação, independente do tratamento. Em substrato moído, ocorreu aumento significativo da germinação na presença de caolim, armazenamento a 4°C no primeiro mês de avaliação, mas a germinação reduziu-se a zero após dois meses de avaliação. Realizou-se teste de colonização em folhas de eucalipto com esporos em que a porcentagem de germinação foi zero, e os esporos colonizaram-nas. Portanto, é possível ocorrer a dormência dos esporos, o que será estudado posteriormente.

ABSTRACT

SARAIVA, Rodrigo Moreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2009.
Mass production of *Clonostachys rosea*. Adviser: Luiz Antonio Maffia. Co-Advisers:
Eduardo S. G. Mizubuti and Robert Weingart Barreto.

It is believed that the biocontrol of gray mold with *C. rosea* under field conditions is viable. However mass production of the antagonist must be optimized and a formulation of low cost and stable over time must be developed. Therefore this research aimed to develop methods to produce and commercialize *C. rosea* in a commercial scale. We evaluated different substrates, the optimization to production, the optimum time to production, the supplementation of substrate, the initial inoculum concentration, the production of spores on absence of light, and the production of spores in different containers. Millet, soybean straw, and bean straw were efficient as substrates to produce spores, which was affected by the level of moisture on each substrate. The addition of V8[®] vegetable juice increased the sporulation on rice. The opening of the container after 6 days of colonization reduced the time to start to collect spores and increased spores production. The range of initial concentration tested (10^3 to 10^8) did not affect the final spores production. After 30 days, it was found no significant difference between the production of spores on absence of light and photoperiod of 12h. We also evaluated the survival of spores of *C. rosea* in a formulation stored at 4°C or laboratory temperature ($24\pm 2^\circ\text{C}$) after different drying times (12, 24, 36 and 48 h) with two solvents (water and sucrose 35%). The survival of spores in ground substrate, with or without Kaulin, stored at 4°C or environment temperature was evaluated. The ability of these spores to colonize leaves of eucalyptus was also evaluated after 4 months storage. The germination of formulated spores of all treatments reduced to zero after 2 months of evaluation. In the ground substrate, germination significantly increased in the presence of Kaulin, storage at 4°C, at the second month of evaluation, but it was zero after 2 months of evaluation. However the fungus colonized eucalyptus leaves even after the formulated spores being stored for 4 months storage. Therefore, it is possible that the spores become dormant, which will be studied later.

1. Introdução

Botrytis cinerea Pers.:Fr., é um patógeno que causa consideráveis perdas econômicas em cultura agrícolas (Agrios, 2005; Jarvis, 1992; Morandi *et al.*, 2000). No Brasil, as principais culturas nas quais o mofo cinzento ocorre são as ornamentais, fruteiras, hortícolas e mudas de eucalipto durante o enraizamento (Morandi & Maffia, 2005). A versatilidade quanto ao parasitismo e a variabilidade genética deste fungo limitam seu controle. Além disso, o uso excessivo de fungicidas para o seu controle envolve altos custos e gera preocupação quanto aos problemas ambientais e de toxicidade, além da perda de eficiência por causa da seleção de isolados resistentes a fungicidas (Moyano *et al.*, 2004; Soulié *et al.*, 2006).

É importante a busca por novos métodos de controle de *B. cinerea*, como o controle biológico. Um dos principais agentes de biocontrole, cuja eficiência foi comprovada no controle de *B. cinerea*, é o fungo *Clonostachys rosea* (Link: Fr.) Schroers, Samuels, Siefert, and W. Gams (Morandi *et al.*, 2000; Morandi *et al.*, 2003; Cota *et al.*, 2008; Peng & Sutton, 1991; Sutton & Peng, 1993; Sutton *et al.*, 1997; Sutton *et al.*, 2002). *Clonostachys rosea* é um hifomiceto que produz conídios unicelulares em conidióforos de dois tipos (penicilado e verticilado), encontrado em diversas regiões do mundo: tropicais, temperadas, subárticas e até desérticas (Nobre *et al.*, 2005; Sutton *et al.*, 1997). Além de competidor, o fungo também é considerado um micoparasita destrutivo de alguns fungos fitopatogênicos, como *Botrytis* spp. (Nobre *et al.*, 2005; Sutton *et al.*, 1997).

No Brasil, vários trabalhos de controle biológico do mofo cinzento por *C. rosea* foram conduzidos, principalmente na Embrapa Meio Ambiente e na Universidade Federal de Viçosa (Cota *et al.*, 2008; Morandi *et al.*, 2000; Morandi *et al.*, 2003; Valdebenito-Sanhueza, 1997; Nobre *et al.*, 2005), em plantas ornamentais e fruteiras. Na região de Bento Gonçalves, RS, *C. rosea* vem sendo produzido em escala semi-comercial pela Embrapa Uva e Vinho (Valdebenito-Sanhueza *et al.*, 1997). *Clonostachys rosea* reduziu em até 100% a esporulação de *B. cinerea* em restos culturais (Tatagiba, 1996; Morandi *et al.*, 2000; 2003). Nos trabalhos conduzidos na UFV e na Embrapa Uva e Vinho, usava-se o isolado Pg 88-710 canadense (Peng & Sutton, 1991). Na busca por isolados brasileiros do antagonista, Nobre *et al.* (2005) selecionaram quatro isolados eficientes em se estabelecer e

suprimir a esporulação do patógeno em folhas de morangueiro, roseira, tomateiro e eucalipto em condições controladas e no controle do mofo cinzento em condições de campo (Cota *et al.*, 2008).

Em vista da eficácia como agente de biocontrole de *B. cinerea*, é necessário o desenvolvimento de um processo para a produção esporos de *C. rosea* em escala comercial. Portanto, demanda-se a produção massal do antagonista, isto é conseguir a maior quantidade de propágulos, no menor período de tempo. Um fator limitante à produção massal é o alto custo, que pode se dever ao alto custo de substrato, ou pela produção do antagonista em grande escala (Fravel, 2005). Assim, a busca por um substrato barato, eficiente na produção massal e de fácil uso é estágio crucial no desenvolvimento de um produto de biocontrole. O meio de cultivo utilizado num processo de fermentação deve atender a critérios como a disponibilidade de nutrientes, facilidade de preparo e esterilização e baixo custo. Adicionalmente, os níveis de umidade e a superfície dos substratos sólidos podem afetar a quantidade e a qualidade dos esporos produzidos. Alguns substratos já foram testados na produção massal de *C. rosea*, como trigo, arroz, bagaço de cana, meio ágar-água, dentre outros (Dall' Onder, 1997; Jensen, 2002; Valdebenito-Sanhueza *et al.*, 1997; Sutton, 1997; Viccini, 2004). Entretanto, na maioria dos trabalhos, a produção de esporos de *C. rosea* segue a metodologia descrita por Sutton & Yu (1994), em grãos de trigo, após incubação durante cerca de 35 dias em média, a 20- 23 °C. Vale frisar que, em grande parte os objetivos destes trabalhos foram testar a eficiência do fungo em controlar o mofo cinzento, e não otimizar o processo de produção do antagonista.

Após o processo de produção, um período mínimo de vida de prateleira é crítico para o sucesso de formulações à base de micro-organismo. A formulação resulta da mistura dos esporos do fungo a substâncias que melhoram a qualidade do produto. Recomenda-se usualmente um prazo de validade mínimo de um ano, com o mínimo de perdas na viabilidade, preferencialmente sem a necessidade de manutenção sob refrigeração (Sarembaud & Feinberg, 2007). No processo de formulação, o desempenho do agente de biocontrole pode ser afetado, e pode-se aumentar ou diminuir a eficiência do controle, além de afetar a vida de prateleira e a segurança do produto (Fravel, 2005).

Neste trabalho, buscou-se preencher algumas lacunas de informação existentes visando o desenvolvimento de um produto à base de *C. rosea*. Os testes realizados visaram o refinamento do protocolo de produção massal de conídios do

fungo, com vistas à sua produção em escala comercial. Além disso, procurou-se definir um método para assegurar maior viabilidade dos esporos do antagonista.

2. Revisão Bibliográfica

Botrytis cinerea

Botrytis cinerea, fase perfeita *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel, é patógeno necrotrófico, haplóide, filamentosos e heterotático que ocorre em todas as regiões agrícolas do mundo. A abundante esporulação acinzentada, em tecidos mortos ou restos de culturas, caracteriza o nome da doença que causa, “mofo cinzento” (Jarvis, 1992). O fungo é patógeno não especializado, que pode infectar mais de 200 espécies de plantas (Jarvis, 1980), característica que o distingue das outras espécies do gênero (Leroux, 2004). A produção de grande quantidade de enzimas relacionada à patogenicidade é fator que pode estar ligado ao caráter polífago (Kamoen, 1992; Kars & van Kan, 2004).

Consideráveis perdas ocorrem principalmente em plantas ornamentais, olerícolas, fruteiras, cereais e essências florestais (Morandi *et al.*, 2000; Jarvis, 1992). No Brasil, problemas com o mofo cinzento aumentaram a partir da década de 90, com a expansão do cultivo protegido, com grandes perdas em plantas ornamentais, olerícolas e mudas de eucalipto no viveiro, durante o enraizamento (Morandi *et al.*, 2002; 2003). Temperaturas entre 15-25°C e umidade relativa acima de 90% favorecem o desenvolvimento do patógeno. Em períodos desfavoráveis, *B.cinerea* sobrevive como micélio em restos de cultura e esporula quando as condições tornam-se favoráveis. Esporos do patógeno são dispersos pelo vento, água da chuva, irrigação, insetos, implementos e ferramentas agrícolas e pelo contato entre órgãos contaminados. A infecção pode ocorrer em quase todos os estádios de desenvolvimento da planta, e em todos os órgãos aéreos, como folhas, haste, flores e frutos (Hausbeck & Pennypacker, 1991; Jarvis, 1980, 1989).

As epidemias de mofo cinzento originam-se, na maioria das vezes, a partir de conídios produzidos nos restos culturais infestados ou da germinação de escleródios. Os sintomas do mofo cinzento podem variar com o hospedeiro e com as condições ambientais. Pode, também, ocorrer infecções latentes, em que, após penetrar, o fungo

paralisa seu crescimento até que as condições ambientais tornem-se favoráveis ao avanço da infecção (Morandi & Maffia, 2005).

A versatilidade quanto ao parasitismo e a variabilidade genética deste fungo limitam o controle, assim, é imprescindível adotar o manejo integrado para que se possa conviver com a doença. Entre estas práticas, incluem-se medidas sanitárias, controle do ambiente, controle químico e o controle biológico.

Controle Biológico

O conceito de controle de doenças mudou nas últimas décadas. Anteriormente, o objetivo era erradicar completamente o patógeno com o uso contínuo de produtos químicos, o que provocou alterações, como a seleção de isolados resistentes, ocorrência de surtos de doenças consideradas como secundárias, redução de micro-organismos benéficos, além de causar efeitos deletérios ao homem, animais e ao ambiente, com o acúmulo de resíduos no solo, água e nos alimentos (Melo & Azevedo, 1998). Em vista desses problemas, aumentou-se a busca por métodos alternativos de controle. Dentre esses, destaca-se o controle biológico, “redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença por um ou mais organismos, realizado naturalmente ou através da manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonista, ou pela introdução em massa de um ou mais antagonistas” (Baker & Cook, 1974).

O controle biológico, diferentemente do químico, não tem efeito imediato, é medida atóxica, e geralmente seu efeito pode estar abaixo do necessário, com a necessidade da integração a outros métodos de controle, estabelecendo-se o que se chama de controle integrado. Em vista de lacunas no conhecimento, como o melhor entendimento da ecologia do patógeno e do antagonista, nem sempre há pleno sucesso do controle biológico. Muitos micro-organismos quando cultivados em grande escala e sucessivamente, podem perder ou reduzir sua capacidade, diminuindo a eficiência e a credibilidade do controle (Grigoletti *et al*, 2000).

Vários antagonistas estudados para o uso como agente de biocontrole de *B.cinerea*, dentre os quais incluem-se *Trichoderma harzianum* (Elad, 1994; Elad & Kirshner, 1993; Elad *et al.*, 1993); *T. inhamatum*, *Cladosporium oxysporum*, *Bacillus subtilis* (Tatagiba *et al.*, 1998); *Penicillium chrysogenum* (Jackson, *et al.*,

1994); *Ulocladium atrum* (Kohl, et al., 2000; 1998; 1999); *Candida oleophila* (Mercier & Wilson, 1994); *Clonostachys rosea* (Sutton et al., 1997), dentre outros.

Uma das estratégias de controle biológico se baseia na competição de um antagonista com o crescimento do patógeno em tecidos mortos (restos culturais), levando a redução no crescimento e esporulação do patógeno em restos culturais (Köhl et al., 1995). Sendo assim, a supressão da infecção e /ou esporulação do patógeno é uma estratégia potencial no que diz respeito ao controle biológico (Fokkema, 1993; Morandi et al., 2003).

Diversas pesquisas demonstram o potencial do fungo *C. rosea* como antagonista contra *B. cinerea*, sendo este fungo capaz, inclusive, de suprimir a esporulação do patógeno (Morandi et al., 2003; Morandi et al., 2000; Sutton & Peng, 1993).

Clonostachys rosea

Um dos principais agentes de biocontrole, cuja eficiência foi comprovada no controle de *B.cinerea*, é o fungo *Clonostachys rosea*. Um isolado de *C. rosea*, denominado Pg 88-710, foi descoberto no final da década de 1980 no Canadá, sendo considerado um eficaz antagonista de *B. cinerea* (Peng & Sutton, 1991). *C. rosea* é um hifomiceto que produz conídios unicelulares em conidióforos de dois tipos, penicilado e verticilado. As colônias do fungo em meio agar-água são geralmente esbranquiçadas, laranjadas ou salmão. Antigamente denominado *Gliocladium roseum*, foi proposto por Domsch et al. 1980, que se tornasse o gênero *Clonostachys*. Hoje é classificado como *Clonostachys rosea*, fase perfeita de *Bionectria ochroleuca* (Schroers et al., 1999).

O fungo *C. rosea* é encontrado em diversas regiões do mundo: tropicais, temperadas, subárticas e até desérticas. Foi relatado em culturas, campo, matas, florestas, água-doce e solos litorâneos, particularmente em locais com pH variando entre neutro e alcalino. O fungo é conhecido por colonizar raízes, hastes, vagens, e sementes de soja, raízes de trevo vermelho, folhas de morango e framboesa (Sutton et al., 1997).

Clonostachys rosea tem gerado grande interesse entre produtores e pesquisadores nos diversos países onde ocorre, entre eles o Brasil (Nobre et al., 2005; Sutton et al., 1997), sendo considerado um micoparasita destrutivo contra

alguns fungos que são patógenos vegetais, incluindo o gênero *Botrytis* (Sutton *et al.*, 1997).

Com objetivo de avaliar a eficiência de isolados de *C. rosea*, Krauss & Soberanis (2001), observaram que cinco isolados do fungo foram eficientes na redução de doenças causadas por *Moniliophthora roreri*; *Moniliophthora perniciosa* e *Phytophthora palmivora*, tanto isoladamente como em combinação dos cinco isolados.

De acordo com Sutton (1995), as características que têm estimulado o uso de *C. rosea* como agente de biocontrole são: atua por competição de substrato, impedindo ou reduzindo o estabelecimento de *B. cinerea*; faz parte da microflora natural; não se desenvolve à temperatura de 37°C; tem baixa toxicidade. Além disso, estudos com microscopia eletrônica de varredura revelaram que *C. rosea* é um eficiente micoparasita de *B. cinerea* (Li *et al.*, 2002). Outra vantagem é a sua capacidade de se estabelecer endofiticamente em tecidos verdes (Köhl & Fokkema, 1998; Morandi *et al.*, 2001; Sutton *et al.*, 1997; Yu e Sutton, 1997).

Vários autores demonstraram, em condições controladas e de campo, a eficácia do fungo em proteger as plantas e reduzir perdas causadas por *B. cinerea*. Em experimento para comparar a eficiência de *C. rosea* e do fungicida Captan® na proteção das flores do morango, principal via de invasão do fruto de morango por *B. cinerea*, o fungo reduziu a incidência do patógeno em estames, de 93% para 79% e em frutos de 76% para 48% em folhas (Sutton *et al.*, 1997). Neste experimento o desempenho de *C. rosea* foi igual ou melhor que o de outros antagonistas e o fungicida. *C. rosea* também foi mais eficaz que Captan® contra *B. cinerea* em frutos de 8 cultivares de morango (Sutton *et al.*, 1997). Em hastes de tomateiro, o antagonista foi capaz de se estabelecer e suprimir a esporulação de *B. cinerea* por 11 semanas após a sua aplicação (Sutton *et al.*, 2002). O antagonista também foi eficiente no controle de *B. cinerea* em vários outros hospedeiros (Shafia *et al.*, 2001; Sutton *et al.*, 1997; Sutton *et al.*, 2002; Yu e Sutton, 1997; Yu e Sutton, 1998). Além disso, proporcionou reduções de até 100% na esporulação de *B. cinerea* em restos culturais (Tatagiba, 1996).

No Brasil, vários trabalhos de controle biológico com *C. rosea* foram conduzidos, principalmente na Embrapa Meio Ambiente e na Universidade Federal de Viçosa (UFV), visando o controle do mofo cinzento em plantas ornamentais e fruteiras. Na região de Bento Gonçalves, RS, *C. rosea* é produzido em escala semi-

comercial pela Embrapa Uva e Vinho (Valdebenito-Sanhueza *et al.*, 1997). Já na UFV, em experimentos conduzidos em casa de vegetação, *C. rosea* foi eficiente em suprimir a esporulação de *B. cinerea* nos restos culturais de roseira, mesmo em condições favoráveis ao patógeno (Morandi *et al.*, 2000; Morandi *et al.*, 2003).

Morandi *et al.* (2000), demonstraram que *C. rosea* é capaz de estabelecer e suprimir a esporulação do patógeno, independente do estágio de desenvolvimento dos tecidos de roseira. Pétalas e folhas frescas, senescentes e mortas foram utilizadas no experimento. Uma porcentagem de esporulação de 41%, 61%, e 75% em folhas frescas, senescentes e mortas foram obtidas respectivamente, enquanto que 48%, 87% e 53% de esporulação em pétalas, foram obtidos em tecidos frescos, senescentes e mortos, respectivamente. Além disso, a inoculação de *B. cinerea*, 0 e 24 horas após a inoculação com *C. rosea* em folhas de rosa com ferimento, reduziram a germinação do patógeno em 25–41% respectivamente e a esporulação em mais de 99%, demonstrando que *C. rosea* é um agente efetivo no controle de produção de inóculo do patógeno. Comparando-se *C. rosea* e o controle químico com mancozeb, os autores demonstraram que a aplicação de *C. rosea* quinzenalmente ou de *C. rosea* + Mancozeb alternados semanalmente, em parcelas com duas variedades de rosas, foram significativamente eficientes em reduzir a esporulação de *B. cinerea*, porém a incidência não foi consistentemente reduzida.

Nos trabalhos realizados tanto na UFV, quanto na Embrapa Uva e Vinho, foi utilizado o isolado canadense Pg 88-710 (Peng & Sutton, 1991). Na busca por isolados brasileiros eficazes, Nobre *et al.* (2005), isolaram *C. rosea* de diferentes locais. Na primeira parte do experimento, os isolados foram selecionados de acordo com sua capacidade de esporulação em meio com agar-água, no qual doze isolados foram selecionados. Dentre estes, quatro isolados foram, em seguida selecionados, por serem tão eficientes quanto o isolado Pg 88-710 em se estabelecer e suprimir a esporulação do patógeno em folhas de morangueiro, roseira, tomateiro e eucalipto. Estudos sobre autoecologia e antagonismo a *B. cinerea*, destes quatro isolados de *C. rosea*, verificaram que temperatura em torno de 25°C é a adequada para o desenvolvimento do fungo. Além disso, estes isolados foram tão eficientes quanto o isolado Pg 88-710, em colonizar tecidos foliares, na ausência ou períodos prolongados de molhamento foliar, em temperaturas ótimas para o patógeno, bem como suprimiram a esporulação de *B. cinerea* em intervalos de aplicação de até 14 dias antes ou após a inoculação do patógeno (Cota *et al.*, 2008).

Em um experimento realizado em campo durante dois anos, Cota (2008), avaliou o potencial de *C. rosea* no controle biológico e no manejo integrado de *B. cinerea*, observando que a associação do controle biológico com outras práticas de manejo, contribuiu para um melhor controle do patógeno. O mesmo autor estudou os gradientes de dispersão tanto de *B. cinerea*, quanto de *C. rosea*. Para *B. cinerea*, não houve efeito pronunciado do vento na dispersão, sendo que os restos de cultura foram importantes para as epidemias de mofo cinzento. Baixa capacidade de dispersão de *C. rosea* foi observada, sendo as distâncias máximas alcançadas foram de 45 e 105 cm, nos sentidos contrários e do vento, respectivamente.

Devido a sua eficácia como agente de biocontrole de *B. cinerea*, a produção de *C. rosea* em grande escala é desejada, além disso, ainda não existe uma formulação que seja ao mesmo tempo de baixo custo, fácil utilização e na qual o agente de biocontrole permaneça viável por maior período de tempo.

Produção Massal de Antagonistas

Dentre os pontos cruciais para viabilizar o uso de micro-organismos, destacam-se a modo de ação, determinação da biologia e ecologia do antagonista, compatibilidade com outros pesticidas, desenvolvimento de um protocolo de produção do inóculo do antagonista em grande escala, de uma formulação estável do micro-organismo, a escolha de um substrato apropriado à produção, a determinação das condições de cultivo, a estocagem do micro-organismo e a demonstração da ausência de riscos tanto ambientais quanto no manuseio do agente microbiano (Elad & Stewart, 2004).

Alguns produtos comerciais são registrados para o controle de *B. cinerea* em outros países, dentre os quais destacam-se Binab na França, que é baseado em *T. harzianum* e *T. polysporum*; Trichodex em Israel, baseado em *T. harzianum* (T39); Aspire nos Estados unidos, baseado na levedura *Candida oleophila* dentre outros (Elad & Stewart, 2004; Fravel, 2005)

Dentre as etapas essenciais para viabilizar o uso de um micro-organismo, uma das mais importantes é a de produção, incluindo a seleção do meio, o tipo de processo utilizado para a produção (fermentação em estado sólido, semi-sólido, líquido) e as condições ótimas para o cultivo (temperatura, umidade, atividade de água, pH, aeração e agitação, entre outras (Viccini, 2004).

O objetivo da produção é conseguir a maior quantidade de propágulos eficazes no menor período de tempo, para isso, a produção massal do antagonista é necessária. Um fator limitante da produção massal é seu alto custo, isto pode ser devido ao alto custo de substrato, ou pelo processo de produção em grande escala (Fravel, 2005). Por estes fatos, a busca por um substrato barato, eficiente na produção massal e de fácil utilização é um estágio crucial no desenvolvimento de um agente de biocontrole.

A produção de propágulos de um antagonista pode ser por fermentação líquida, difásica ou sólida. A utilização da técnica de produção de propágulos em estado sólido é vantajosa, pois este processo fornece vantagens como baixo custo, praticidade e fácil execução. Outra vantagem é o fato de que esporos produzidos em estado sólido serem mais robustos e apresentarem maior longevidade que esporos produzidos em fermentação em estado líquido (Jensen *et al.*, 2002). A fermentação sólida consiste no uso de substratos sólidos como grãos de cereais e resíduos agrícolas com pequenas quantidades de água no substrato e ausência de água livre (Pandey, 2003).

O meio de cultivo utilizado num processo de fermentação deve satisfazer critérios como a disponibilidade de nutrientes, fácil preparação e esterilização e baixo custo. Além da disponibilidade de nutrientes, os níveis de umidade e a superfície dos substratos sólidos podem influenciar tanto a quantidade, quanto a qualidade dos esporos produzidos. Vários são os substratos utilizados na produção massal de antagonistas (Viccini, 2004; Fravel, 2005).

Pomella (1999), testando a produção massal de conídios de *Duosporium yamadanum* em fermentação líquida, fermentação difásica e fermentação sólida com diferentes substratos (arroz, cevada, sorgo, milho, grão de bico e trigo), observou que fermentação líquida não foi apropriada para a produção de conídios, sendo que a utilização da técnica difásica e fermentação sólida resultaram na produção de grande quantidade de conídios. As quantidades mais expressivas de conídios foram obtidas quando se utilizou aveia e arroz.

A produção de esporos de *C. rosea* é feita, na maioria dos trabalhos, de acordo com a metodologia descrita por Sutton & Yu, (1994), segundo a qual, *C. rosea* cresce em grãos de trigo durante 35 dias em média, em uma temperatura que varia de 20 a 23°C. Outros substratos e metodologias de produção vêm sendo testados nos últimos anos. Viccini (2004), utilizando grãos de trigo e arroz para

produção de esporos de *C. rosea*, observou que a produção de esporos, em 40 dias de fermentação, obtida utilizando arroz como substrato ($1,05 \times 10^9$ esporos g^{-1} substrato) foi uma ordem de magnitude maior aquela obtida sobre grãos de trigo ($1,47 \times 10^8$ esporos g^{-1} substrato). Entretanto, Sutton *et al.*, (1997) alcançaram resultados melhores de produção de esporos, utilizando com substrato grãos de trigo (1 a 5×10^9 esporos g^{-1} obtido em 35 dias de fermentação). Arroz foi um eficaz substrato utilizado para produção massal de propágulos de *C. rosea* em experimento conduzidos por Krauss & Soberanis (2001).

Surge a necessidade de se avaliar substratos alternativos e ao mesmo tempo eficientes para a multiplicação desse fungo. Morandi (1997), avaliando grãos de trigo, arroz com casca, arroz integral e folhas de roseira, observou que nas folhas de rosa, esporulação abundante ocorreu após 15 dias ($3,9 \times 10^8$ conídios/g), enquanto que nos grãos, esporulação abundante ocorreu somente após 40 dias ($5,7 \times 10^8$; $6,1 \times 10^8$; $6,4 \times 10^8$ conídios/g em trigo, arroz com casca e arroz integral, respectivamente).

Uma mistura de turfa, farelo de trigo e água (15:26:59), foi utilizada na produção de conídios de um isolado de *C. rosea* (IK726), e a sobrevivência destes com conídios produzidos em meio líquido. Após 14 dias de incubação, $5-7 \times 10^8$ de esporos g^{-1} foram obtidos, o substrato foi espalhado em uma camada fina em filtro de papel esterelizado e seco por 2 dias em câmara de fluxo laminar a $21^\circ C$ antes de ser armazenado (Jensen *et al.*, 2002). Diferentes substratos, também foram avaliados por Krauss & Soberanis (2002). Um meio líquido (mollases $80 g l^{-1}$, neopeptona $10 g l^{-1}$ e extrato de levedura $2 g l^{-1}$), arroz de alta qualidade (mais de 80% de grãos intactos), arroz de baixa qualidade (menos de 30 % de grãos intactos) misturado com bagaço de cana (1:1 p/p), Biodac® (complexo de celulose) e Guata (fibra de poliéster) foram comparados. Além de comparar os substratos, outra variável avaliada foi uma pré-fermentação antes da inoculação do antagonista nos substratos.

Formulação

A principal característica no desenvolvimento das formulações de agentes de controle biológico é o favorecimento da atividade do antagonista na interação antagonista-patógeno. Em geral, formulação é a maneira de apresentar o ingrediente ativo em uma forma física mais efetiva com respeito à atividade biológica,

estocagem e aplicação (Moretini & Melo, 2007). No processo de formulação, o desempenho do agente de biocontrole pode ser afetado, podendo haver aumento ou redução de eficiência do controle, além de afetar a vida útil e a segurança do produto (Fravel, 2005).

Uma formulação pode ser líquida ou sólida. A produção de propágulos em estado sólido fornece algumas vantagens, como baixo custo, facilitar o transporte e armazenamento e um menor risco de contaminação (Jensen *et al.*, 2002; Stirling *et al.*, 1998).

A formulação de antagonistas para uso comercial, geralmente envolve a mistura de propágulos viáveis com materiais inertes, como caolim e fonte de nutrientes, que produzem pó molháveis ou grânulos. Estes ajudam a estabilizar, podendo aumentar o período de estocagem e facilitar o uso na aplicação. A natureza do antagonista, o patógeno alvo, o local de ação e da aplicação são os principais fatores que determinam o tipo de formulação (Sabaratnam & Traquair, 2002).

Um adequado período de vida de prateleira é crucial para o sucesso comercial de uma formulação a base de micro-organismo. Um prazo de validade mínimo de 1 ano, com o mínimo de perdas na viabilidade, de preferência sem refrigeração, é, portanto recomendado (Sarembaud & Feinberg, 2007). A preservação de produtos biológicos é fortemente influenciada por fatores externos. Principalmente, oxigênio, dióxido de carbono, etileno, umidade relativa do ar, pressão ou estresse mecânico, luz e temperatura (Sarembaud & Feinberg, 2007).

Tem sido obtida a estabilidade em formulação com conídios secos pela mistura de esporos com vários materiais (principalmente material argiloso). Moretini & Melo, (2007) com o objetivo de desenvolver uma formulação com *Coniothyrium minitans* capaz de controlar o mofo-branco, encapsularam esporos deste fungo com diferentes polímeros (alginato de sódio e pectina cítrica), caolim e substratos naturais (farinha de trigo e celulose). Das combinações obtidas, a formulação que continha 0,5% de alginato, 1,5% de celulose e 5% de caolim apresentou os melhores resultados quanto à viabilidade do fungo e controle da doença. Os grânulos da formulação armazenados a 4°C apresentaram 100% de viabilidade do fungo após dois meses. Nos grânulos armazenados a 28°C, o fungo perdeu capacidade de crescer após os primeiros dois meses.

Hjeljord *et al.* (2000), demonstraram que conídios de *Trichoderma* spp. formulados em produtos comerciais germinam e colonizam mais lentamente folhas

de morango senescentes do que conídios frescos, embora não houvesse nenhuma diferença na média da germinação em laboratório. Sabaratnam & Traquair, (2002), demonstraram que as populações de *Streptomyces* sp. permaneceram estáveis em pó e grânulos de amido durante 10-14 semanas e que as preparações foram mais estáveis a 4°C que 24°C. A sobrevivência de *Arthobotrys dactyloide*, foi baixa quando a biomassa do fungo foi misturada a Kaulin e vermiculita, utilizados como carreadores e uma goma arábica utilizada como ligante e posteriormente granuladas e secas. Entretanto, a incubação dos grânulos úmidos por 3 dias a 25 °C em um saco plástico estéril com ar estéril antes da secagem melhorou significativamente a atividade biológica desta preparação (Stirling *et al.*, 1997). McGuire & Hagenmaier (1996), demonstraram que o revestimento das células de *Candida oleophila* com uma goma látex melhorou significativamente a sobrevivência da levedura em aplicação pós-colheita de uva. A adição da goma não foi tóxica para as células, mesmo com a adição de 2% de etanol. Após 4 meses de armazenamento a 13°C, populações entre 10⁴ e 10⁵ UFC/cm² eram encontradas, demonstrando a eficiência da goma látex na manutenção da viabilidade.

Wraight *et al.* (2001), relatam que umidade e temperatura são fatores importantes quando se deseja armazenar o agente de biocontrole. A secagem rápida de conídios pode ser uma estratégia eficiente para manter a viabilidade dos propágulos por um período maior. Assim, Jensen *et al.* (2002), demonstraram que a viabilidade de um isolado de *C. rosea* foi melhor quando os conídios foram submetidos a rápida secagem, após produção massal em 20 dias em uma mistura contendo turfa, farelo de trigo e água.

Miller (1995), citado por Wraight *et al.* (2001), relata que a remoção de oxigênio da atmosfera de armazenamento preserva a viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* por 12 meses a 37°C.

A eficiência no armazenamento de uma formulação, também é dependente da embalagem de armazenamento. Por exemplo, uma formulação com baixa umidade ou armazenado a vácuo, requer embalagens impermeáveis, sendo a de folhas laminadas de polietileno-alumínio as mais adequadas. Em contraposição, formulação onde o oxigênio é necessário para sobrevivência do antagonista, embalagens de polietileno, são eficientes. Estas permitem as trocas gasosas, e forma uma barreira contra perda e ganho de umidade. Sacolas plásticas, sacos de alumínio, potes de polipropileno são embalagens já utilizadas no armazenamento de *C. rosea*.

A utilização de dessecantes (por exemplo, sílica gel) pode ser utilizada nas formulações e melhora sua capacidade de armazenamento em temperatura ambiente (Jensen *et al.*, 2002).

É necessário elucidar quais as condições de cultivo permitem obter maior produção de biomassa fúngica, com maior eficiência e menor custo. Para isso é necessário definir qual o melhor meio de cultivo e quais as condições de temperatura e umidade mais adequadas, além de definir uma metodologia de produção, visando maior viabilidade dos esporos do agente de biocontrole.

3. Material e Métodos

Condições gerais dos experimentos

Realizaram-se os experimentos no Laboratório de Epidemiologia do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

Utilizaram-se quatro isolados de *C. rosea* obtidos em condições brasileiras: NCR19/F, NCR60/F, NCR61/F e NCR62/F, selecionados pela capacidade de estabelecimento e de supressão da esporulação de *B. cinerea* em folhas de morangueiro, tomateiro, roseira e eucalipto (Cota *et al.*, 2008). Estes isolados estão preservados em tubos de ensaio com meio batata-dextrose-ágar (BDA) e mantidos a 4°C. Para preparo do inóculo, transferiram-se os isolados para novos tubos com BDA, mantendo-os a 24°C sob fotoperíodo de 12 h. Após 8 dias, adicionaram-se 10 mL de água destilada esterilizada (ADE) aos tubos e raspou-se a superfície do meio com alça de repicagem, para liberação dos esporos. Com auxílio de hemacitômetro ajustou-se a suspensão de cada isolado para 10⁶ esporos/mL. Para execução dos experimentos, misturaram-se as suspensões dos quatro isolados e adicionaram-se 20 mg e cloranfenicol/l.

Para avaliação dos experimentos 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, listados a seguir, misturou-se 1g de cada substrato por 30 s em um volume de ADE conhecido mais 0,1 µl de Tween 80. Filtrou-se a suspensão em um jogo de peneiras (125 e 500 mesh) e o número médio de esporos foi determinado com o auxílio do hemacitômetro.

Para os experimentos em que realizou-se incubação em fotoperíodo de 12h, utilizou-se uma estrutura vertical (3.40 x 0.65 x 0.6 m) com luz do tipo fluorescente.

3.1 Substratos para a produção massal

Nesses experimentos, objetivou-se comparar os seguintes substratos para a produção massal de *C. rosea*: arroz, arroz integral, arroz parboilizado, canjiquinha, grãos de milho, bagaço de cana triturado, aveia, trigo, milheto, palha de café, grãos de girassol sem tegumento, palha de soja e palha de feijão. O teor de umidade de cada substrato foi ajustada para 30%, 50% ou 70 % p:v (primeiro experimento) ou v:v (segundo e terceiro experimentos). Após autoclavagem por 40 minutos, nos substratos aplicaram-se 10 ml de suspensão a 10^6 esporos ml^{-1} , incubando-se a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h. Após 30 dias de incubação, quantificou-se a produção de esporos.

Os experimentos foram executados em delineamento inteiramente casualizado e em esquema fatorial com 13 (substratos) x 3 (níveis de umidade dos substratos), com três repetições. Cada unidade experimental constituiu-se de um saco de polipropileno autoclavável contendo 100 ml ou 100 g do substrato.

3.2 Tempo de colonização e influência da secagem do substrato na produção de esporos

Nesse experimento, objetivou-se determinar o tempo ótimo de produção de esporos em grãos de arroz acondicionados em sacos plásticos fechados ou abertos. Após autoclavagem por 40 minutos, aplicaram-se 10 ml de suspensão com 10^6 esporos ml^{-1} nos sacos, incubando-se a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ fotoperíodo de 12 h.

Compararam-se os tratamentos; i- Sacos mantidos fechados até o momento de cada avaliação; ii- Sacos abertos após 3 dias do semeio do inóculo; iii- Sacos abertos após 6 dias do semeio do inóculo e iv- Sacos abertos após 9 dias do semeio do inóculo. Avaliou-se a produção de conídios a cada cinco dias e durante os 30 dias de incubação.

Os experimentos foram executados em delineamento inteiramente casualizado e em esquema fatorial 6 (tempos de avaliação) x 4 (tratamentos), com três repetições. Cada unidade experimental constituiu-se de um saco de polipropileno autoclavável contendo 100 ml de arroz agulhinha no um teor de umidade de 50%. A cada avaliação, três sacolas de cada tratamento foram descartadas, ou seja, efetuou-se amostragem destrutiva.

Foram conduzidos mais dois experimentos em grãos de arroz acondicionados em frascos erlenmeyers.

3.3 Suplementação do substrato básico

Realizaram-se três experimentos, para quantificar a influência de adição de nutrientes ao substrato para produção de esporos. Utilizaram-se como substratos, grãos de arroz ou palha de soja (umidade 50% v/v). Após autoclavagem por 40 min, nos substratos aplicaram-se 10 ml de suspensão a 10^6 esporos ml^{-1} , incubando-se a $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h. Avaliou-se a adição dos suplementos: i- carbonato de cálcio 1%; ii- carbonato de cálcio 10%, iii- Sulfato de amônio 1%; iv- sulfato de amônio 10%; v- sacarose 1%; vi- sacarose 10%; vii- suco de vegetais V8[®] 10%; viii- melão de cana 0,2% ; iv - sem suplementação (testemunha). Os sacos plásticos foram acondicionados a $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas, mantidos fechados até o momento da avaliação. Após 30 dias quantificou-se a produção de esporos.

Os experimentos foram executados em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Cada unidade experimental constituiu-se de um saco de polipropileno autoclavável contendo 100 ml dos substratos.

3.4 Influência da concentração inicial de esporos na produção massal

Avaliou-se o efeito da concentração inicial de esporos na produção massal de *C. rosea*. Compararam-se as concentrações: i- 10^3 ; ii- 10^4 , iii- 10^5 , iv- 10^6 , v- 10^7 , vi- 10^8 esporos/ml. Grãos de arroz tipo agulhinha (umidade de 50% v/v) foram acondicionados em sacos plásticos e autoclavados por 40 minutos. Após autoclavagem, nos sacos aplicaram-se 10 ml de suspensão a 10^6 esporos ml^{-1} , incubando-se a $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h, e foram mantidos fechados até o momento da avaliação. Após 30 dias quantificou-se a produção de esporos.

Os experimentos foram executados em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Cada unidade experimental constituiu-se de um saco de polipropileno autoclavável contendo 100 ml do substrato.

3.5 Produção de esporos em diferentes recipientes

Compararam-se os tratamentos: i – Produção em erlenmeyers; ii – Produção em saco de plástico autoclavável.

Após autoclavagem por 40 min, os substratos foram inoculados com 10 ml de suspensão a 10^6 esporos ml^{-1} , incubando-se a $24^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ fotoperíodo de 12 h, e foram mantidos fechados até o momento da avaliação. Após 30 dias quantificou-se a produção de esporos.

O experimento foi executado em delineamento inteiramente casualizado, com 11 repetições. Cada unidade experimental foi um saco plástico de prolipropileno autoclavável ou erlenmeyers contendo 100 ml de arroz agulhinha e 50% de umidade.

3.6 Influência do fotoperíodo na produção de esporos

Grãos de arroz tipo agulhinha (umidade de 50% v/v) foram acondicionados em sacos plásticos e autoclavados por 40 min. Após autoclavagem, nos substratos aplicaram-se 10 ml de suspensão a 10^6 esporos ml^{-1} , incubando-se a $24^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h (luz fluorescente) ou no escuro, e foram mantidos fechados até o momento da avaliação. Realizaram-se três experimentos, nos quais quantificou-se a produção de esporos após 30 dias (Experimento 1 e 2) e a cada cinco dias (Experimento 3).

Os experimentos 1 e 2 foram executados em delineamento inteiramente casualizado e com 11 repetições. O experimento 3 foi em delineamento inteiramente casualizado e esquema fatorial 2 (fotoperíodo) x 6 (intervalos de avaliação), com três repetições. Cada unidade experimental foi um saco plástico contendo 100 ml de arroz agulhinha e 50% de umidade.

3.7 Viabilidade de esporos em formulação

Realizaram-se dois experimentos, a 4°C e em temperatura ambiente ($25^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$), para quantificar a influência de diferentes diluentes e tempo de secagem na sobrevivência de esporos de *C. rosea*.

Após produção de esporos, conforme o descrito no item 2.4, misturou-se o substrato em ADE. Depositou-se a suspensão sobre papel filtro Whatman® No.1 colocado sobre um funil de Buchner e Kitassato acoplado a uma bomba de vácuo, a qual foi acionada até a completa remoção da água livre. Em seguida, ressuspendeu-se a biomassa de esporos em dois diluentes: solução de sacarose a 35% e ADE. Novamente filtrou-se a suspensão obtida em papel filtro Whatman® No. 1, e com auxílio de um bisturi, raspou-se a massa de esporos depositada no papel filtro, retirando-se uma amostra para avaliação prévia da germinação. Em seguida, os esporos foram secos em câmara de crescimento a 18°, temperatura determinada em teste preliminar, por diferentes intervalos (0, 12, 24 e 36 h), misturados com caolim (1:1) e acondicionados em microtubos tipo Eppendorf.

Quantificaram-se a umidade inicial e após os tempos de secagem, a umidade final (base seca), por diferença de peso. Os esporos foram acondicionados a 4°C (experimento 1), ou em temperatura ambiente (experimento 2). Para determinar a porcentagem de germinação, depositaram-se 10µl de suspensão 10⁶ de esporos ml⁻¹ em uma lamínula, a qual foi acondicionada em gerbox contendo espuma umedecida, mantendo-se o conjunto a 25°C. Após 12 h, depositou-se uma gota de lactofucsina sobre a lamínula e determinou-se a germinação dos 100 primeiros esporos avistados em microscópio ótico (40 X). Considerou-se germinado o esporo com tubo germinativo igual ou maior ao seu comprimento. Repetiu-se o procedimento mensalmente para avaliar a sobrevivência dos esporos.

Os experimentos foram executados em delineamento inteiramente casualizado e esquema fatorial 2 (diluentes) x 4 (Tempo de secagem), com três repetições. Cada unidade experimental foi um microtubo tipo Eppendorf contendo 1g de esporos e caolim (1:1).

3.8 Viabilidade de esporos em substrato triturado

Esporos foram produzidos conforme o descrito no item 2.4. Após a completa colonização do substrato e esporulação do antagonista, secou-se o substrato a 18°C, temperatura determinada em teste preliminar, em câmara de crescimento por 24 h. Quantificou-se a umidade inicial e após o tempo de secagem, o substrato foi moído, e determinou-se a umidade final por diferença de peso (base seca). Os grãos moídos foram misturados com caolim ou não, e acondicionados em microtubos tipo

epENDORF os quais foram mantidos em geladeira (4°C) ou em temperatura ambiente (25°C). Avaliou-se a viabilidade dos conídios conforme descrito no item 2.7.

Os experimentos foram executados em delineamento inteiramente casualizado e esquema fatorial 2 (temperaturas de armazenamento) x 2 (com ou sem caolim) e com seis repetições. Cada unidade experimental foi um microtubo tipo eppENDORF contendo 1g de esporos.

3.9 Colonização de folhas de eucalipto por *Clonostachys rosea*

Avaliou-se a capacidade de os esporos de *C. rosea* produzidos em massa em colonizar folhas de eucalipto. Compararam-se os tratamentos: i – Esporos novos coletados após incubação de 30 dias; ii – Esporos armazenados por 9 anos em grãos de trigo triturados; iii – Esporos secos por 12 h a 18°C, diluente água e armazenados durante 4 meses em temperatura ambiente; iv - Esporos secos por 24 h a 18°C, diluente água e armazenados durante 4 meses em temperatura ambiente; v - Esporos secos por 36 h a 18°C, diluente água e armazenados durante 4 meses em temperatura ambiente; vi - Esporos secos por 48 h a 18°C, diluente água e armazenados durante 4 meses em temperatura ambiente; vii - Esporos secos por 12 h a 18°C, diluente água e armazenados durante 4 meses a 4°C; viii - Esporos secos por 24 h a 18°C, diluente água e armazenados durante 4 meses a 4°C; ix - Esporos secos por 36 h a 18°C, diluente água e armazenados durante 4 meses a 4°C; x - Esporos secos por 48 h a 18°C, diluente água e armazenados durante 4 meses a 4°C; xi – Esporos secos por 12 h a 18°C, diluente sacarose 35% e armazenados durante 4 meses em temperatura ambiente; xii - Esporos secos por 24 h a 18°C, diluente sacarose 35% e armazenados durante 4 meses em temperatura ambiente; xiii - Esporos secos por 36 h a 18°C, diluente sacarose 35% e armazenados durante 4 meses em temperatura ambiente; xiv - Esporos secos por 48 h a 18°C, diluente sacarose 35% e armazenados durante 4 meses em temperatura ambiente; xv - Esporos secos por 12 h a 18°C, diluente sacarose 35% e armazenados durante 4 meses a 4°C; xvi - Esporos secos por 24 h a 18°C, diluente sacarose 35% e armazenados durante 4 meses a 4°C; xvii - Esporos secos por 36 h a 18°C, diluente sacarose 35% e armazenados durante 4 meses a 4°C; xviii - Esporos secos por 48 h a 18°C, diluente sacarose 35% e armazenados durante 4 meses a 4°C e xix –água.

Os esporos foram produzidos e coletados conforme descrito no item 2.4 e 2.7 respectivamente. A porcentagem de germinação dos conídios foi quantificada conforme descrito no item 2.7.

Folhas retiradas de plantas de eucalipto (híbrido de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*), com oito meses de idade foram acondicionadas em caixas tipo gerbox contendo espuma úmida. As folhas foram inoculadas com suspensão de 10^6 conídios/ml com auxílio de um atomizador tipo De Vilbiss. Após 12 h de incubação a 25°C, confeccionaram-se discos foliares de 1 cm de diâmetro os quais foram depositados em meio paraquat-cloranfenicol-ágar em placas de petri (Peng & Sutton, 1991), incubando-se a 25°C. Após 10-12 dias, quantificou-se a colonização dos tecidos foliares por *C. rosea* utilizando uma escala diagramática, desenvolvida para estimar indiretamente a colonização de discos de folhas de morangos por *C. rosea* baseado na densidade de conidióforos do agente na superfície foliar (Nobre *et al.*, 2005).

O experimento foi executado em delineamento inteiramente casualizado com 19 tratamentos e cinco repetições. Cada unidade experimental foi um gerbox contendo duas folhas de eucalipto.

3.10 Análise dos dados

Efetuuou-se o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade dos erros. Para atender a análise de variância (ANOVA), alguns dados foram transformados para logaritmo decimal, os quais serão descritos posteriormente nas análises.

Os dados foram submetidos à análise de variância. Quando pertinente realizou-se teste de Scott Knott e análises de regressão pelos programas SAEG e SAS, respectivamente.

4. Resultados

Para atender às pressuposições da análise de variância, os dados dos experimentos descritos em 4.1, 4.2 e 4.3 foram transformados para Log (Esporos).

4.1 Substratos para a produção massal

Nos três experimentos, houve diferença significativa entre os substratos ($P < 0,001$). No primeiro experimento observou-se interação substrato x umidade ($P < 0,001$). Pelo teste de Scott Knott (5% probabilidade), com 30% de umidade, formaram-se seis grupos (médias de produção de esporos entre 9,7 e 0); para a umidade de 50%, formaram-se 7 grupos (médias entre 10,2 e 0); e para a umidade de 70%, formaram-se nove grupos (médias entre 9,7 e 0). No segundo experimento não houve interação substrato x umidade ($P = 0,0987$). Pelo teste de Scott Knott (5% probabilidade), formaram-se 5 grupos (médias entre 8,43 e 0). No terceiro experimento, houve interação substrato x umidade ($P < 0,001$). Pelo teste de Scott Knott (5% probabilidade), para a umidade de 30%, formaram-se cinco grupos (médias entre 8,85 e 0); para a umidade de 50%, formaram-se oito grupos (médias entre 8,88 e 0); e para umidade de 70%, formaram-se oito grupos (médias entre 8,29 e 0) (Tabela 1). Em geral, observou-se que milho, palha de feijão, palha de soja foram substratos em que houve maior produção quando comparados com trigo. Já aveia e girassol foram os piores substratos (Tabela 1).

4.2 Tempo de colonização e influência da secagem do substrato na produção de esporos

Para determinar ótimo de produção para cada dia de abertura, ajustou-se os modelos de regressões linear e quadrática aos dados, dependendo do experimento e tempo de abertura e calculou-se o ponto de máximo para avaliação ou coleta de esporos (Tabela 2). Plotou-se a curva de produção em cada abertura (Figura 1A, 1B e 1C). Observou-se que o ótimo de produção varia com o tratamento.

Para determinar qual melhor tempo de abertura do recipiente após a colonização do substrato, calculou-se a área abaixo da curva (AAC), realizou-se a ANOVA ($P = 0,0043$, $0,0024$ e $0,0007$, para os experimento 1, 2 e 3, respectivamente) e ajustou-se o modelo quadrático aos dados para os três experimentos (Tabela 3). Observou-se diferença significativa para AAC pela análise de variância, sendo a abertura aos 5-6 dias, ideal para produção de esporos. Plotou-se a curva de AAC para cada experimento (Figura 2). As médias de área abaixo da curva encontram-se na Tabela 2.

4.3 Suplementação do substrato básico

Pelo teste de Tukey (5% probabilidade), observou-se diferença significativa na produção de esporos entre os tratamentos no experimento utilizando arroz como substrato ($P < 0,0001$), mas não foi observada diferença significativa quando utilizou-se palha de soja como substrato ($P = 0,0658$). Para o experimento em arroz, formaram-se dois grupos na primeira execução do experimento. Observou-se maior produção de esporos com o tratamento V8® (média de produção de esporos = 8,63). Nos demais tratamentos as médias de produção de esporos não diferiram entre si e variaram entre 8,01 e 7,84. Para a segunda execução, formaram-se três grupos. Observou-se maior produção de esporos com o tratamento V8® (média de produção de esporos = 8,80), para os tratamentos sacarose 1%, sacarose 10%, carbonato de cálcio 1%, carbonato de cálcio 10%, sulfato de amônio 1% e tratamento sem adição de suplementos, as médias de produção de esporos variaram entre 8,67 e 8,37). Observou-se menor produção de esporos com o tratamento sulfato de amônio 10% (média de produção de esporos = 7,99) (Figura 3A e 3B). Para o experimento com palha de soja, a média de produção máxima foi de 8,003 (V8®) e mínima de 7,39 (Sacarose) (Figura 3C).

4.4 Influência da concentração inicial de esporos na produção massal

Pela análise de variância, observou-se diferença significativa entre as concentrações iniciais no experimento 1 ($P = 0,003$), mas não no experimento 2 ($P = 0,0578$). No experimento 1, as médias de produção de esporos variaram entre 8,30 e 7,87 para as concentrações iniciais a 10^5 e 10^8 , respectivamente. Ajustou-se o modelo quadrático aos dados para o experimento 1 (Figura 4), em que a relação produção de esporos (y) e concentração inicial de inóculo (X) foi assim definida: $y = 7,26 + 0,41X - 0,042X^2$, $R^2 = 0,54$. O ponto máximo de produção (8,30 esporos/g⁻¹) ocorreu na concentração de 10^5 . Para o experimento 2, as médias de produção variaram entre 8,46 para concentração inicial igual a 10^6 e 8,1 para concentração inicial igual a 10^8 (Figura 4).

4.5 Produção de esporos em diferentes recipientes

Pelo teste “t”, e verificou-se diferença significativa entre produção de esporos de *C. rosea* em sacola plástica autoclavável e produção em erlenmeyer ($P = 0,0001$). A produção média de esporos em erlenmeyer foi de 8,43, enquanto que em sacola plástica foi de 8,10.

4.6 Influência do fotoperíodo na produção de esporos

Não houve diferença significativa entre produção no escuro e sob fotoperíodo de 12 h ($P = 0,1328$ e $0,9475$, para os experimentos 1 e 2 respectivamente). Entretanto, no terceiro experimento, observou-se diferença significativa quando avaliado a produção de esporos ao longo do tempo, sendo que a produção iniciou-se primeiro na presença de luz. Calculou-se a área abaixo da curva de produção de esporos (AAC), no experimento 3 e observou-se que não ocorreu efeito significativo na produção final após 30 dias ($P = 0,4112$). As médias de AAC foram de 8,94 e 8,69, para produção no escuro e sob fotoperíodo de 12h, respectivamente. A produção média de esporos em fotoperíodo de 12 horas e na ausência de luz foram 7,75 e 7,57 (primeiro experimento) e 7,69 e 7,42 (segundo experimento), respectivamente. Plotou-se a curva de produção de esporos aos dias 5, 10, 15, 20, 25 e 33 dias (Figura 5).

4.7 Viabilidade de esporos em formulação

Nos dois experimentos, após dois meses de avaliação, a germinação dos esporos de *C. rosea* tendeu a zero para todos os tratamentos. Não houve efeito de diluente, tempo de secagem e a interação em nenhum tratamento, em ambos os experimentos. Para o experimento a 4°C, as médias de germinação variaram entre 76 e 85 % na primeira avaliação (1° dia) e entre 29,4 e 34% na segunda avaliação (30° dias). Para o experimento em temperatura ambiente, as médias de germinação variaram entre 61,3 e 80% na primeira avaliação (1° dia) e entre 23 e 38% na segunda avaliação (30° dia).

Não houve correlação entre a umidade de armazenamento e a germinação dos conídios ($P = 0,1417$).

4.8 Viabilidade de esporos em substrato triturado

Observou-se efeito significativo da interação entre inerte x temperatura de armazenamento ($P = 0,006$) no 30º dia de avaliação. A presença de caolim e armazenamento a 4°C mantiveram a germinação significativamente maior no 30º dia, mas no segundo mês, não se observou diferença entre os tratamentos. No 60º dia, a avaliação a germinação foi zero em todos os tratamentos (Figura 6).

As umidades inicial e final médias foram 69,89% e 30,64% (base seca), respectivamente. Não houve correlação entre umidade final e germinação ($P = 0,1428$).

4.9 Colonização de folhas de eucalipto por *Clonostachys rosea*

A colonização e a germinação diferiram entre os tratamentos ($P < 0,001$ para ambos). Aplicou-se o teste de Scott Knott ($\alpha = 0,05$), e ocorreu a formação de 4 grupos para colonização: A- com 5 tratamentos (média de colonização variando entre 71,98% e 60,90%); B- com 2 tratamentos (média de colonização variando entre 50,16% e 46,6%); C- com 6 tratamentos (média de colonização variando entre 32,28% e 19,56%); e D- com 5 tratamentos (média de colonização variando entre 15,36% e 4,32%). Para germinação, formaram-se somente dois grupos: A- com um tratamento (inóculo novo com germinação igual a 85,8%) e B- com os demais 17 tratamentos (germinação variando entre 2,8% e 0%) (Tabela 4).

5. Discussão

A viabilidade do uso de agentes de biocontrole no desenvolvimento de um produto comercial depende de metodologia adequada para produção em grande escala. Uma das técnicas utilizadas na produção de fungos é a fermentação sólida, em resíduos agrícolas e cereais. Há alguns substratos já testados para produção massal de *C.rosea* (Köhl *et al.*, 1995; Sutton *et al.*, 2002, 1997, 1993; Jensen *et al.*, 2002, 2007, Valdebenito-Sanhueza *et al.*, 1997; Morandi *et al.*, 2003, 2001, 2000; Viccini, 2004), entretanto, somente Viccini (2004) relata com mais detalhe o processo de produção de esporos. Na maioria dos trabalhos utilizou-se apenas trigo

para produção, à semelhança de Sutton *et al.* (1997). Entretanto, o trigo é um substrato caro, e o seu uso aumentaria o custo de produção no Brasil. Assim, demanda-se avaliar outros substratos, o que foi testado aqui. Ocorreu variabilidade entre os experimentos para seleção de substrato.

Em geral, alta umidade (70%) e baixa umidade (30%), resultaram em menor produção. A alta umidade, provavelmente, prejudica a distribuição de inóculo e a aeração e conseqüentemente o crescimento micelial e a produção de esporos (Macedo, 2006). Além disso, a contagem no hemacitômetro tornou-se difícil, em vista do excesso de impurezas ou porque em alguns casos, o substrato tornou-se muito viscoso, fato já observado (Dall' Onder, 1997). Observou-se a formação de massa pegajosa, principalmente em girassol e aveia, em todas as umidades testadas. O mesmo ocorreu com arroz parbolizado, apesar dos resultados do primeiro experimento. A baixa umidade, provavelmente, afeta o crescimento do fungo, além de reduzir a condutividade térmica e a disponibilidade de nutrientes (Ellaiah *et al.*, 2004). Esse fato provavelmente relaciona-se à baixa produção em palhas de soja e de feijão no primeiro experimento, pois a umidade foi definida em peso *versus* volume, o que fez com que a umidade fosse insuficiente nestes substratos, já que o volume da palha é superior ao de grãos de cereais. Os teores de umidade ideais para esporulação variam entre micro-organismos. Para produção massal de *Penicilium oxalicum* Currie & Thon., usado no controle de *Fusarium oxysporum* Schlentend. f. sp. *lycopersici*, maior esporulação ocorreu entre 30 e 40% (Larena *et al.*, 2002), enquanto para *Mucor bacilliformis* Hesselt, foi em torno de 90% (Larei *et al.*, 2006).

Baseando-se nos critérios de maior produtividade de esporos, propriedades desejáveis do substrato que não comprometessem a produção (ex: viscosidade), custo e disponibilidade, conclui-se que palha de soja, palha de feijão e milho são substratos adequados para a produção de *C. rosea*. Milho já vem sendo utilizado eficientemente na produção comercial de *Trichoderma stromaticum* Samuels *et al.*, no produto comercial Tricovab produzido pela CEPLAC (Bastos, 2008). Apesar de ser o substrato mais utilizado para esporulação de *C. rosea*, o trigo não foi o mais eficiente na produção. Resultados semelhantes foram encontrados por Viccini (2004), a qual utilizando 75% de umidade, observou que a produção do antagonista foi significativamente maior em arroz agulhinha ($0,68 \times 10^9$ esporos g⁻¹) e arroz parbolizado ($1,05 \times 10^9$ esporos g⁻¹) que em trigo ($1,47 \times 10^8$ esporos g⁻¹).

A variabilidade dos dados, quanto à produção nos diferentes substratos, talvez deva-se à dificuldade de controlar outros fatores, como o pH e a umidade do substrato durante o processo de produção. A alteração de pH pode ocorrer pela liberação de metabólitos do próprio fungo (Agrios, 2005), e a alteração da umidade pode ocorrer com a troca de umidade do ambiente e o substrato. Ao se quantificar a fração de água ao longo do tempo, no processo de produção de *C. rosea* em arroz, observou-se variação na disponibilidade de água, sendo que em todas as avaliações o teor de umidade reduziu (Viccini, 2004). Em diferentes trabalhos, com metodologias similares ou não às aqui utilizadas, obteve-se também variação na produção final do fungo, como: $1-5 \times 10^9$ (Morandi, 2003), 5×10^6 (Dall' Onder, 1997) e 1×10^7 esporos/g de trigo (Sutton *et al.*, 2002); e, $5-7 \times 10^8$ cfu/g de uma mistura de turfa, farelo de trigo e água (15:26:59) (Jensen *et al.*, 2002).

Para alguns fungos, a secagem do meio estimula a esporulação (Agrios, 2005), o que ocorre no processo de produção de *C. rosea* (Sutton, *et al.*, 1997; Sutton *et al.*, 2002). A secagem durante o processo estimula a formação de conidióforos penicilados, enquanto, em alta umidade, ocorre predominância de conidióforos verticilados (Sutton *et al.*, 1997). Este fato é importante, pois conidióforos penicilados produzem maior quantidade de esporos (Sutton *et al.*, 1997). Vários trabalhos relatam o processo de secagem de substrato no processo de produção de esporos de *C. rosea*. Sutton *et al.* (1997) observaram que após um período inicial de colonização em grãos de trigo (14-18 dias), a secagem lenta do substrato estimulou a esporulação do fungo. Nos presentes experimentos, o ótimo de produção dependeu do tempo de abertura do recipiente após colonização do substrato. A abertura após 5 a 6 dias de colonização foi o ideal para aumentar e antecipar o processo de produção. Com a abertura entre 5-6 dias, pode-se coletar os esporos após 25-27 dias. Há procedimentos diferentes nos trabalhos de produção de *C. rosea*, quanto ao tempo de incubação (Morandi *et al.*, 2003; Peng *et al.*, 1992; Sutton *et al.*, 1997; Sutton *et al.*, 2002). Os resultados podem ser utilizados para estabelecer um método padrão para a produção de *C. rosea* em larga escala. Quanto menor o tempo de produção, menor será o tempo de exposição do material, com isso, menor o risco de contaminação. Além disso, a redução do tempo de incubação reduz o custo de produção. O local de incubação e o tamanho deste também podem ser planejados com base no tempo ideal de incubação, sistematizando o processo.

A adição de suplementos, como uréia e sacarose, no substrato pode aumentar a esporulação de alguns fungos (Macedo, 2006). A suplementação de resíduos agrícolas com 0,1 e 0,5 % de NPK influenciou positivamente a produção de *Psathyrella atroumbonata*, um fungo comestível, enquanto com uréia (0,5, 1 e 2%), a produtividade reduziu (Ayodele *et al.*, 2007). Para *Coniothyrium minitans*, agente de controle de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary., a adição de sacarose ao substrato reduziu a produção de esporos, mas aumentou a colonização do fungo. A suplementação de arroz com carbonato de cálcio aumentou a produção de esporos de *Duosporium yamadanum*, um potencial bio-herbicida, enquanto a adição de uréia reduziu a produção (Macedo, 2006). Para *C.rosea*, a adição de carbonato de cálcio, melaço e sacarose não afetou a produção de esporos em arroz. No segundo experimento, a adição de 10% de sulfato de amônio reduziu a produção de esporos, provavelmente em vista de um desbalanço entre carbono e nitrogênio (Ayodele *et al.*, 2007), ou intoxicação pela alta concentração de nitrogênio. A adição de suco de vegetais V8[®] em ambos os experimentos aumentou significativamente a esporulação do fungo. Segundo o fabricante, V8[®] é rico em sódio, potássio e vitaminas, e a compensação nutricional com este suplemento pode ter influenciado a produção de esporos de *C. rosea* em grãos de arroz. Quando se usou palha de soja, não ocorreu diferença significativa entre quaisquer dos tratamentos. Segundo os resultados, a palha de soja é um substrato mais completo que o arroz na produção de *C.rosea*, e dispensa as suplementações usadas. Entretanto, não se descarta a possibilidade de avaliar a suplementação deste substrato com outros componentes, como diferentes vitaminas.

Nos trabalhos de produção massal de *C. rosea*, não há padronização quando se inocula um substrato. Diferentes concentrações iniciais foram usadas nos diferentes trabalhos com produção deste fungo (Sutton *et al.*, 2002; Dall'Onder, 1997; Valdebenito-Sanhueza *et al.*, 1997; Morandi *et al.*, 2003). Em altas concentrações os esporos podem produzir substâncias que podem inibir a germinação (Mordocco, 2000). Em baixas concentrações, o processo de produção pode ser retardado. Apesar da diferença significativa no primeiro experimento, houve baixa relação entre concentração do inóculo inicial de *C. rosea* com a produção. Assim, aparentemente, a produção de *C. rosea* independe da concentração inicial no intervalo testado pelo experimento. Em experimento de otimização de produção de *C. rosea*, observou-se resultado semelhante (Viccini, 2004). Este fato é importante,

pois é possível, com baixas concentrações de inóculo inicial, reduzir a quantidade do inóculo inicial e, conseqüentemente, reduzir o custo de produção.

Na produção de esporos *C. rosea* utilizam-se diferentes condições de temperatura (de 18 a 30 °C) e de fotoperíodo (12, 14 ou 24 h de luz por dia). A temperatura em torno de 24°C é ideal para desenvolvimento de *C.rosea* (Cota *et al.*, 2008), mas os trabalhos não relatam a influência do fotoperíodo na produção massal deste fungo. A maioria dos fungos sensíveis à luz esporula quando expostos à luz contínua, mas alguns, chamados de esporuladores diurnos, requerem um período no escuro seguido por um período no claro (Dhingra & Sinclair, 1995). Alguns fungos requerem luz para iniciar a formação de conidióforo e a esporogênese, mas a esporulação é inibida pela luz (Dhingra & Sinclair, 1995). Não ocorreu diferença na produção final de esporos de *C. rosea* em condições de escuro e de fotoperíodo de 12 h. Porém, a produção no escuro iniciou-se posteriormente à em 12 h e a colonização no substrato foi de maneira mais intensa, com micélio, branco, denso e cotonoso. Com o fotoperíodo de 12 h, a massa micelial foi menos densa, rala e mais escura. Resultados semelhantes foram relatados por Viccini (2004), quando comparou os períodos de 0, 12, 14 e 24 h de luz: com 0 h, ocorreu a formação de muito micélio aéreo, cotonoso e também foi o último tratamento a iniciar a esporulação. No trabalho não é relatado a diferença entre produtividade de esporos. Esses resultados provavelmente estejam relacionados ao fato de que, embora muitos fungos necessitem de um estímulo luminoso, outros podem esporular no escuro (Dhingra & Sinclair, 1995). A observação de que *C. rosea* pode esporular na ausência de luz é importante para a produção em larga escala, em vista da economia de energia e da redução do custo de produção.

Em conclusão, definiu-se uma metodologia eficaz para produção de *C.rosea* com baixo custo. O uso de um substrato eficiente, milheto, palha de soja ou palha de feijão, produção na ausência de luz ou com fotoperíodo menor para estimular a esporulação, concentração inicial de inóculo baixa, e coleta de esporos após 25-27 dias são pontos de partida para os demais trabalhos com o fungo.

Após estabelecer um método eficiente para produção massal, a segunda etapa é obter estabilidade e viabilidade deste fungo (Fravel, 2005). Um prazo de validade mínimo de 1 ano, com o mínimo de perdas na viabilidade, de preferência sem refrigeração, é desejável (Sarembaud & Feinberg, 2007). Cada micro-organismo requer condições específicas para manter sua viabilidade, e os principais fatores são

oxigênio, dióxido de carbono, etileno, umidade relativa do ar, pressão ou estresse mecânico, luz e temperatura (Sarembaud & Feinberg, 2007). O processo, local, tipo de secagem e as condições de armazenamento variam com o micro-organismo e afetam a viabilidade (Churchil, 1982). Para *C. rosea*, não foi possível determinar uma metodologia para manter a viabilidade dos esporos avaliada pela quantificação de germinação de esporos. Esse tipo de avaliação é uma metodologia comum nos testes de viabilidade de agentes de biocontrole (Matsuki *et al.*, 1997; Pomella, 1999).

Se tivesse adotado apenas a germinação de esporos para avaliar a viabilidade, a conclusão seria de que esporos de *C. rosea* não sobrevivem por longos períodos, com os métodos de secagem e armazenamento utilizados nos experimentos. Este fato seria válido para os experimentos de formulação e o de sobrevivência em grãos. A germinação caiu em torno de 50% na segunda avaliação e tendeu a zero no terceiro mês de avaliação em todos os tratamentos de ambos os experimentos. No experimento de sobrevivência em grãos moídos, quando se usou caolim, e se armazenou em geladeira, a germinação manteve-se alta, mas também tendeu a zero no segundo mês. Kaulin é um ingrediente inerte que ajuda manter a viabilidade dos esporos, enquanto o armazenamento a 4°C reduz o metabolismo de micro-organismos (Agrios, 2005), conseqüentemente, ajuda a manter a viabilidade.

Quando se efetuou o teste de colonização de folhas de eucaliptos, com os esporos armazenados a 4 meses, mesmo com a baixa germinação, os esporos do fungo permaneciam viáveis e capazes de colonizar o hospedeiro. Isto provavelmente ocorreu devido a uma característica genética ou ambiental, em que na ausência de hospedeiro, baixo teor de umidade e/ou baixo teor de oxigênio o fungo entraria em estado de dormência (Agrios, 2005). Pelos resultados do teste de colonização, não se pode concluir sobre a influência de algum dos tratamentos utilizados no experimento. Em outros trabalhos, quando se avaliou a eficácia de controle após um período de armazenamento, observou-se que o fungo conseguia sobreviver por mais tempo. Esporos armazenados por até 8 ou 32 semanas foram tão eficientes quanto esporos frescos, no controle de *Fusarium culmorum* (Jensen *et al.*, 2000). Esporos de *C. rosea* produzidos em trigo e armazenados por mais de um ano a 3-5°C e durante três meses a 20-23°C, não perderam a eficácia no biocontrole de *B. cinerea* (Sutton *et al.*, 1997). Obteve-se eficiência de 80% de controle de *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker, com o uso de esporos de *C. rosea* armazenados em cevada por

quatro meses a 4°C ou armazenados por 6 meses a 20°C em sílica gel (Jensen *et al.*, 2002).

A porcentagem de umidade afeta consideravelmente a viabilidade de esporos fúngicos (Matsuki *et al.*, 1997). Entretanto, para *C. rosea*, a umidade não se correlacionou à germinação. Em geral, a amplitude de umidade atingida nos métodos foi estreita e a umidade permaneceu relativamente alta. A adição de sacarose à suspensão de propágulos de fungos antes de seu processamento para armazenamento, pode ajudar durante a secagem e aumentar a vida de prateleira (Caesar & Burr, 1991), mas não se observou este efeito para esporos de *C.rosea*.

Conclui-se que, apesar de não se ter obtido metodologia bem definida para armazenamento de *C. rosea*, o fungo permaneceu viável após quatro meses de armazenamento. Adicionalmente, demandam-se estudos para investigar o possível mecanismo de dormência dos esporos do fungo. Sugere-se sejam realizadas novas avaliações com diferentes tempos de secagem e que sejam testadas novas formulações, por exemplo, adição de outros inertes ou formulação líquida. Sugere-se, ainda, sejam feitas avaliações da eficácia de controle de *B. cinerea*, visto que as condições de produção e o armazenamento podem afetar a efetividade dos esporos.

6. Conclusões

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que:

- . Milheto e palhas de soja e de feijão são substratos potenciais para produção massal de *C. rosea*;

- . A suplementação pode ser importante na produção, dependendo do substrato;

- . Abrir o recipiente a 5-6 dias de incubação aumenta a produção e reduz o tempo de coleta;

- . A concentração inicial de inóculo não é fator determinante de produção de esporos;

- . Há maior produção de esporos em erlenmeyer que em saco plástico ;

- . *Clonostachys rosea* produz conídios na ausência de luz, bem como em fotoperíodo de 12h;

- . O teste de germinação não é eficiente para determinar a viabilidade de conídios;

- . Segundo o teste de colonização, *C. rosea* sobreviveu por período superior a quatro meses.

7. Referências Bibliográficas

- Agrios, G. N. **Plant Pathology**. San Diego: Academic Press, 5º ed., 2005.
- Ayodele, S. M.; Okhuoya, J. A. Effect of substrate supplementation with wheat bran, NPK and urea on *Psathyrella atroumbonata* Pegler sporophore yield. **African Journal of Biotechnology**, v.6, p.1414-1417, 2007.
- Baker, K. F.; Cook, R. J. Biological control of pathogens. San Francisco: Freeman and Company. 433p, 1974.
- Bastos, C. N. Method for preservation of viability and antagonistic activity of *Trichoderma stromaticum*, biocontrol agent of witches' broom disease of cocoa. **Summa Phytopathologica**. V.34, p. 265-266, 2008.
- Boff, P. & Köhl, J. Biological Control of Gray Mold with *Ulocladium atrum* in Annual Strawberry Crops. **Plant Disease**, v. 86, p.220-224, 2002.
- Caesar, A.J. & Burr, T.J. Effect of conditioning, betaine, and sucrose on survival of rhizobacteria in powder formulations. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.168-172, 1991.
- Churchill, B.W. Mass production of microorganisms for biological control. In: Biological Control of Weeds with Plant Pathogens. New York: John Willey. p. 134-156.1982.
- Cota L.V., Maffia L.A., Mizubuti E.S.G., Macedo P.E.F., Antunes R.F. Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. **Biological Control**, v.46, p.515-522, 2008.
- Cota, L. V.; Maffia, L.A. & Mizubuti, E.S.G. Brazilian isolates of *Clonostachys rosea*: colonization under different temperature and moisture conditions and temporal dynamics on strawberry leaves. **Letters in Applied Microbiology**, v.46, p.312-317, 2008.
- Dall'Onder, G.M. Produção e eficiência de conídios e biomassa de *Gliocladium roseum* no controle de *Botrytis cinerea* em morangueiro. (**Dissertação de Mestrado**). Porto Alegre, RS. 1997.
- Dhingra, O.D. & Sinclair, J.B. Basic plant pathology methods. CRC Press, Inc., New York. USA. 1995.
- Dorcas, B. & Arcas, J. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-state fermentation with forced aeration. **Enzyme and Microbial Technology**, v.23, p.5001-5005, 1998.
- Elad, Y. Biological control of grape grey mould by *Trichoderma harzianum*. **Crop Protection**, v. 13, p. 35-38, 1994.

Elad, Y. & Kirshner, B. 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**, v. 21, p. 303-13, 1993.

Elad, Y.; Kirshner, B. & Gotlib, Y. Attempts to control *Botrytis cinerea* on roses by pre- and postharvest treatments with biological and chemical agents. **Crop Protection**, v. 12, p. 69-73, 1993.

Elad, Y. & Stewart, A. Microbial Control of Botrytis. In: Elad, Y.; Williamson, B.; Tudzynski, P. & Delen, N. Botrytis: Biology, Pathology and Control. Kluwer Academic Publishers, p. 223-236. 2004.

Fokkema, N. J. Opportunities and problems of control of foliar pathogens with micro-organisms. **Pesticide Science**, v. 37, p. 411-16, 1993.

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

Grigoletti Jr, A.; Santos, A. F. dos. & Auer, C. G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. In: **Floresta** , v. 30. Edição especial. 200p. 2000.

Hausbeck, M. K. & Pennypacker, S. P. Influence of grower activity on concentrations of airborne conidia of *Botrytis cinerea* among geranium cuttings. **Plant Disease**, v. 75, p. 1236-43, 1991.

Hjeljord, L.G.; Stensvand, A. & Tronsmo, A. Effect of temperature and nutrient stress on the capacity of commercial Trichoderma products to control *Botrytis cinerea* and *Mucor piriformis* in greenhouse strawberries. **Biological Control**, v.19, p.149-160. 2000.

Jackson, A. J.; Walters, D. R.; Marshall, G. Evaluation of *Penicillium chrisogenum* and its antifungal extracts as potencial biological control agents against *Botrytis fabae* on faba beans. **Mycological Research**, v. 98, p. 1117-26, 1994.

Jarvis, W. R. Managing Diseases in Greenhouse Crops. **Plant Disease**, v. 73, p.190-94, 1989.

Jarvis, W. R. Epidemiology. In: Coley-Smith, J. R.; Verhoeff, K. & Jarvis, W. R. (Eds.) **The Biology of Botrytis**. London: Academic Press, 1980.

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

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

Jensen, D.F.; Knudsen, I.M.B.; Lubeck, M.; Mamarabadi, M. & Hockenhull, J. Development of a biocontrol agent for plant disease control with special emphasis

on the near commercial fungal antagonist *Clonostachys rosea* strain 'IK726'. **Australasian Plant Pathology**, v.36, p.95-101, 2007.

Jensen, B.; Knudsen, I.M.B. & Jensen, D.F. Survival of conidia of *Clonostachys rosea* on stored barley seeds and their biocontrol efficacy against seed-borne *Bipolaris sorokiniana*. **Biocontrol Science and Technological**, v.12 p. 427–41. 2002.

Kamoen, O. *Botrytis cinerea*: host-pathogen interactions. In: **10th International Botrytis Symposium**, 1992, Heraklion, Crete, Greece. Proceedings.10th International Botrytis Symposium: 1992.

Kars, I. & van Kan, A.L. Extracellular Enzymes and Metabolites Involved in Pathogenesis of Botrytis. In: Elad, Y.; Williamson, B.; Tudzynski, P. & Delen, N. Botrytis: **Biology, Pathology and Control**. Kluwer Academic Publishers, p. 195-216. 2004.

Köhl, J. & Fokkema, N. J. Biological control of *Botrytis cinerea* by suppression of sporulation. In: **The 1998 Brighton Conference - Pests & Diseases**, Proceedings. p. 681-86. 1998.

Köhl, J.; Gerlagh, M.; De Haas, B. H. & Krijger, M. C. Biological control of *Botrytis cinerea* in cyclamen with *Ulocladium atrum* and *Gliocladium roseum* under commercial growing conditions. **Phytopathology**, v. 88, p. 568-75, 1998.

Köhl, J.; Gerlagh, M. & Grit, G. Biocontrol of *Botrytis cinerea* by *Ulocladium atrum* in different production systems of cyclamen. **Plant Disease**, v. 84, p. 569-73, 2000.

Köhl, J.; Lomabers-van der Plas, C. H.; Molhoek, W. M. L. & Kessel, G. J. T. Competitive ability of the antagonists *Ulocladium atrum* and *Gliocladium roseum* at temperatures favourable for *Botrytis spp.* development. **Biocontrol**, v. 44, p. 329-46, 1999.

Köhl, J.; Molhoek, W. M. L.; Van der Plas, C. H. & Fokkema, N. J. Suppression of sporulation of *Botrytis spp.* as a valid biocontrol strategy. **European Journal of Plant Pathology**, v.101, p.251-59, 1995.

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

Krauss, U., Soberanis, W. Effect of fertilization and biocontrol application frequency on cocoa pod diseases. **Biological Control**, v.24, p.82-89.2002.

Larena, I.; Melgajero, P.; De Cal, A. Production, survival, and evaluation of solid-state inocula of *Penicillium oxalicum*, a biocontrol agent against Fusarium wilt of tomato. **Phytopathology**, v.92, p.863 – 869, 2002.

Lareo, C.; Sposito, A. F.; Bossio, S. L.; Volpe, D. C. Characterization of growth and sporulation of *Mucor bacilliformis* in solid fermentation on an inert support. **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, p.391 – 399, 2006.

Leroux, P. Chemical Control of Botrytis and its Resistance to Chemical Fungicide. In: Elad, Y.; Williamson, B.; Tudzynski, P. & Delen, N. Botrytis: **Biology, Pathology and Control**. Kluwer Academic Publishers, p. 195-216. 2004.

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

Macedo, D.M. *Duosporium yamadatum*: Produção massal, formulação e associação com herbicidas para o controle de tiririca. (Tese de Mestrado). 2006.

Matsuki, T., Negishi, H., Honda, M. & Fujimori, T. An improved method for preparation and preservation of conidia for *Nybmia scirpicola*, pathogenic fungus for *Eleocharis kuroguwai*. **Journal Pesticide Science**, v.22, p.39-41, 1997.

Melo, I. S. de & Azevedo, J. L. de, ed. **Controle Biológico** : v. 1. Jaguariúna, SP, Embrapa, 262p. 1998.

Mercier, J. & Wilson, C. L. Colonization of apple wounds by naturally occurring microflora and introduced *Candida oleophila* and their effect on infection by *Botrytis cinerea* during storage. **Biological Control**, v. 4, p. 138-44, 1994.

Morandi, M.A.B. *Gliocladium roseum* como agente de biocontrole de *Botrytis cinerea* em roseiras cultivadas em casa de vegetação. (Tese de Mestrado). Viçosa, MG, 1997.

Morandi, M. A. B.; Maffia, L. A.; Mizubuti, E. S. G.; Alfenas, A. C. & Barbosa, J. G. Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: a valuable component in Botrytis blight management in commercial greenhouses. **Biological Control**, v.26, p.311–317, 2003.

Morandi, M.A.B. & Maffia, L.A. **Manejo Integrado do Mofo cinzento por *Botrytis cinerea***. Jaguariúna, SP. 2005.

Morandi, M. A. B.; Maffia, L. A. & Sutton, J. C. Development of *Clonostachys rosea* and interactions with *Botrytis cinerea* in rose leaves and residues. **Phytoparasitica**, v. 29, p. 1-11, 2001.

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

Moretini, A. & de Melo, I.S. Formulation of *Coniothyrium minitans* for biocontrol of white mold caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v.42, p.155-161. 2007.

Moyano, C.; Gomez, V. & Melgarejo, P. Resistance to pyrimethanil and other fungicides in *Botrytis cinerea* populations collected on vegetable crops in Spain. **Journal of Plant Pathology**, v.152, p. 484-490. 2004.

Mordocco, A. **Fermentation Studies of Conidia Production by *Metarhizium anisopliae***. Thesis (Doctor of Philosophy) – The University of Queensland, Austrália, 2000.

Nobre, S.A.M.; Maffia, L.A.; Mizubuti, E.S.G.; Cota, L.V. & Dias, A.P.S. Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. **Biological Control**, v.34, p.132-143. 2005.

Pandey, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.81-84, 2003.

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

Peng, G.; Sutton, J.C.; Kevan, P.G. Effectiveness of honey bees for applying the biocontrol agent *Gliocladium roseum* to strawberry flowers to suppress *Botrytis cinerea*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.14(2), p.114-129, 1992.

Pfirter, H.A., Guntli, D., Ruess, M. & Défago, G. Preservation, mass production and storage of *Stagonospora convolvuli*, a bioherbicide candidate for field bindweed (*Convolvulus arvensis*). **BioControl**, v. 44, p.437–447. 1999.

Pomella, A.W.V. Avaliação do fungo *Duosporium yamadanum* no controle biológico da tiririca (*Cyperus rotundus*). (**Tese de Doutorado**) – Universidade Federal de Viçosa, MG, 1999.

Sabaratnam, S. & Traquair, J.A. Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. **Biological Control**, v.23, p.245–53. 2002.

Sánchez-Murillo, R.I.; Torre-Martínez, M.; Aguirre-Linares, J.; Herrera-Estrella, A. Light-regulated asexual reproduction in *Paecilomyces fumosoroseus*. **Microbiology**, v.150, p.311-319, 2004.

Sarembaud J.A. & Feinberg M. Comparison of shelf-life appraisal techniques for the estimation of the limiting date of stability for agrifood reference materials. **Analytica Chimica ACTA**, v.603, p.75-83, 2007.

Schoroers, H.J.; Samuels, G.J.; Seifert, K.A. & Gams, W. Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *G. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. **Mycologia**, v.91, p.365-385, 1999.

Shafia, A.; Sutton, J. C.; Yu, H. & Fletcher, J. T. Influence of preinoculation light intensity on development and interactions of *Botrytis cinerea* and *Clonostachys*

rosea in tomato leaves. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.23, p.346-57, 2001.

Soulié, M.C.; Perino, C.; Piffeteau, A.; Choquer, M.; Malfatti, P.; Cimerman, A.; Kunz, C.; Boccara, M. & Vidal-Cros, A. *Botrytis cinerea* virulence is drastically reduced after disruption of chitin synthase class III gene (Bchs3a). **Cellular Microbiology**, v.8, p.1310-1321, 2006.

Sutton, J.C. Evaluation of micro-organisms for biocontrol: *Botrytis cinerea* and strawberry, a case study. **Advances in Plant Pathology** v.2, New York, Academic Press. p.173-190, 1995.

Sutton, J. C.; Liu, W.; Hwang, R. & Owen-going, N. Ability of *Clonostachys rosea* to establish and suppress sporulation potential of *Botrytis cinerea* in defoliated stems of hydroponic greenhouse tomatoes. **Biocontrol Science and Technology**, v. 12, p. 413-25, 2002.

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

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

Sutton, J.C. & Yu, H. **Inoculum production of *Gliocladium roseum***. Ontario: Department of Environmental Biology. University of Guelph, 1p., 1994.

Stirling, G.R.; Smith, L.J.; Licastro, K.A. & Eden, L.M. Control of root-knot nematode with formulations of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys dactyloides*. **Biological Control**, v.11, p.224–30, 1998.

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

Tatagiba, J.S. Avaliação de microorganismos para o controle biológico de *Botrytis cinerea* em roseira. **(Tese de Mestrado)**. Viçosa, MG, 1996.

Valdebenito-Sanhuenza, R. M.; Sutton, J. C.; Perazzolo, I. & Czermainski, A. B. C. Controle Biológico de *Botrytis cinerea* em morangueiros cultivados em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 69-73, 1997.

Viccini, G. Otimização da Produção de Esporos do Fungo *Clonostachys rosea* – um Biopesticida Para a Cultura do Morangueiro **(Tese de Mestrado)**. Paraná, PR. 2004.

Viccini, G.; Mannich, M.; Capalbo, D.M.F.; Valdebenito-Sanhueza, R. & Mitchell, D.A. Spore production in solid-state fermentation of rice by *Clonostachys rosea*, a biopesticide for gray mold of strawberries. **Process Biochemistry**, v.42, p.275-278, 2007.

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

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

Wraight, S.P.; Jackson, M.A. & de Kock, S.L. Production, Stabilization and Formulation Biocontrol. In: Butt, T.M.; Jackson, C.W. & Magan, N. Fungi as Biocontrol Agents: **Progress, Problems and Potential**. Cab International. 2001.

8. Tabelas

Tabela 1 – Produção de esporos de *C. rosea* em diferentes substratos e teores de umidade, incubação a 24°C, fotoperíodo de 12h. Avaliação após 30 dias. Os dados foram transformados para log10 (esporos)/g substrato. Médias de três repetições.

Experimento 1				Experimento 2		Experimento 3			
(P:V)*	Umidade			(V:V)**		(V:V)**	Umidade		
Substrato	30%	50%	70%	Substrato	Sem interação	Substrato	30%	50%	70%
Arroz Parboilizado	9,70	10,24	9,67	Palha de Soja	8,43	Milheto	8,85	8,88	8,29
	A	A	A		A		A	A	A
Milheto	9,68	9,58	9,51	Palha de Feijão	8,23	Arroz Integral	8,63	8,69	8,08
	A	B	B		A		A	B	B
Canjiquinha	9,55	9,57	9,31	Milheto	7,42	Palha de Soja	8,5	8,56	7,53
	A	B	C		B		A	B	C
Arroz Integral	9,37	9,51	9,29	Arroz Integral	7,25	Palha de Feijão	8,46	8,25	7,5
	B	B	C		B		A	C	C
Aveia	9,25	9,15	9,22	Palha de Café	7,05	Arroz Agulhinha	7,95	8,23	7,49
	B	C	D		C		B	C	C
Arroz Agulhinha	9,03	9,05	9,08	Milho	6,98	Arroz Parboilizado	7,86	8,09	7,38
	C	C	E		C		B	C	D
Milho	8,77	8,89	8,80	Bagaço de Cana	6,94	Canjiquinha	7,23	7,61	7,24
	D	D	F		C		C	D	E
Trigo	8,72	8,79	8,77	Arroz Parboilizado	6,88	Palha de Café	6,91	7,53	7,23
	D	D	F		C		C	D	E
Palha de Café	7,78	8,79	8,71	Trigo	6,82	Bagaço de Cana	7,77	6,98	6,93
	E	D	G		C		D	E	F
Palha de Soja	0	8,56	8,65	Arroz Agulhinha	6,38	Trigo	6,6	6,74	6,84
	F	F	G		D		D	F	G
Palha de Feijão	0	7,89	7,94	Canjiquinha	6,02	Milho	6,55	6,53	6,8
	F	F	H		E		D	G	G
Bagaço de Cana	0	0	0	Aveia	0	Aveia	0	0	0
	F	H	I		F		E	H	H
Girassol	0	0	0	Girassol	0	Girassol	0	0	0
	F	H	I		F		E	H	H

Dados transformados para Log (Esporos).

* Valores em Peso : Volume.

** Valores em Volume : Volume.

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott Knott ($\alpha = 0,005$).

Tabela 2 – Modelo, função, ponto de máximo de avaliação e área abaixo da curva (AAC), para produção de esporos de *C.rosea* de acordo com cada tratamento.

Experimento 1				
Abertura	Modelo	Função	Ponto de máximo	Média de AAC
0	Linear	$Y = 7.33 + 0.035A$	*	9.43
3	Linear	$Y = 8.09 + 0.012A$	*	9.67
6	Quadrático	$Y = 6.69 + 0.15A - 0.0030A^2$	25 DIAS	9.73
9	Quadrático	$Y = 6.35 + 0.16A - 0.0034A^2$	23.5 DIAS	9.56
Experimento 2				
Abertura	Modelo	Função	Ponto de máximo	Média de AAC
0	Linear	$Y = 8.01 + 0.038A$	*	10.24
3	Linear	$Y = 8.10 + 0.039A$	*	10.34
6	Quadrático	$Y = 7.56 + 0.14A - 0.0029A^2$	24 DIAS	10.36
9	Quadrático	$Y = 7.61 + 0.12A - 0.0024A^2$	25 DIAS	10.26
Experimento 3				
Abertura	Modelo	Função	Ponto de máximo	Média de AAC
0	Quadrático	$Y = 5.88 + 0.13A - 0.0024A^2$	27 DIAS	8.68
3	Linear	$Y = 7.52 + 0.0062A$	*	9.41
6	Quadrático	$Y = 5.65 + 0.21A - 0.0042A^2$	25 DIAS	9.34
9	Quadrático	$Y = 5.60 + 0.19A - 0.0038A^2$	25 DIAS	9.18

* Não foi possível estimar o ponto de máximo no intervalo de tempo avaliado.

Tabela 3 – Função de produção de esporos de *C.rosea* baseado na área abaixo da curva e ponto de máximo de abertura de recipiente.

Experimento	Função	Ponto de Máximo
1	$Y = 9.43 + 0.11A - 0.011A^2$	5 DIAS
2	$Y = 10.2 + 0.051A - 0.005A^2$	5 DIAS
3	$Y = 8.71 + 0.27A - 0.0234A^2$	6 DIAS

Tabela 4 – Colonização de folhas de eucalipto por *Clonostachys rosea*, após 4 meses de armazenamento dos esporos. Após inoculação, as folhas foram mantidas em câmara de crescimento a 20°C por 10 dias.

Armazenamento	Tem. Secagem	Diluyente	Tratamento	Média Colonização	Média Germinação
-	-	-	Inóculo Novo	71,98	85,8
				A	A
TA*	48	Água	35	66,94	0
				A	B
TA*	12	Água	26	63,92	0,8
				A	B
4°C	36	Água	7	63,56	1,2
				A	B
TA*	36	Água	32	60,9	0,8
				A	B
TA*	48	Sacarose	46	50,16	1,4
				B	B
4°C	12	Sacarose	13	46,6	0
				B	B
-	-	-	Inóculo Velho (1999)	32,28	1,8
				C	B
4°C	36	Sacarose	20	34,5	1,8
				C	B
4°C	24	Sacarose	17	24,1	1,2
				C	B
4°C	12	Água	1	23,42	2,8
				C	B
TA*	36	Sacarose	45	22,12	0,4
				C	B
TA*	24	Sacarose	40	19,56	0
				C	B
4°C	48	Água	11	15,36	1,2
				D	B
-	-	-	Água	7,52	0
				D	B
TA*	12	Sacarose	39	5,36	0
				D	B
4°C	48	Sacarose	24	5,1	0,6
				D	B
TA*	24	Água	30	4,32	0
				D	B

* TA = Temperatura Ambiente.

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott Knott ($\alpha = 0,005$).

9. Figuras

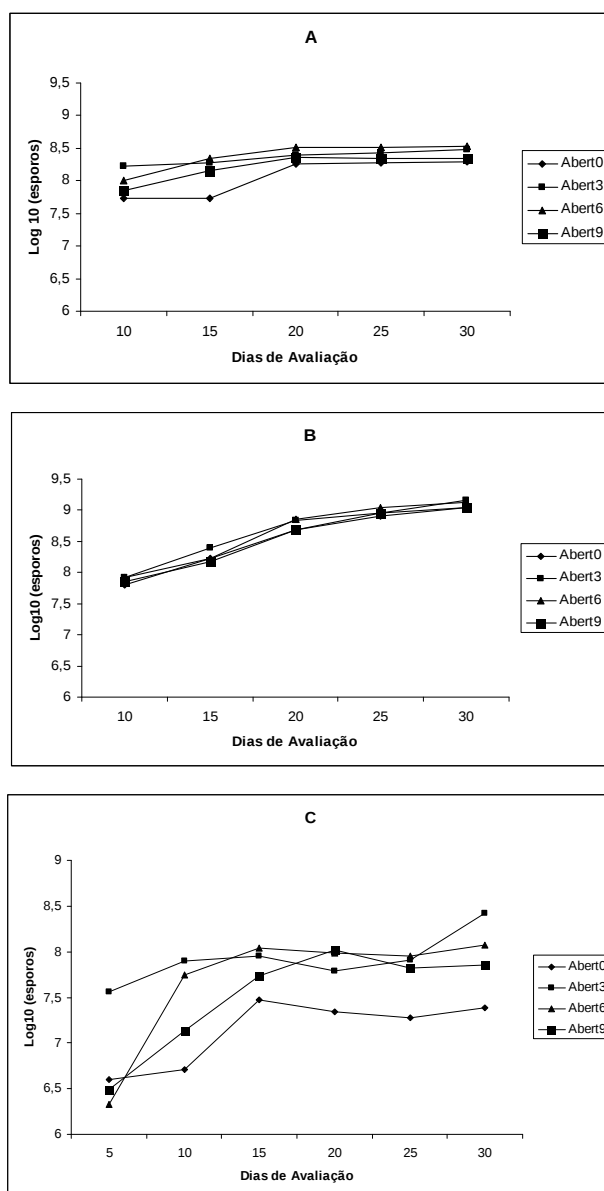


Figura 1 – Produção de esporos de *C.rosea* ao longo do tempo, nos experimentos 1 (A), 2 (B) e 3 (C). Incubação a 24°C, fotoperíodo de 12h, médias de três repetições por ponto.

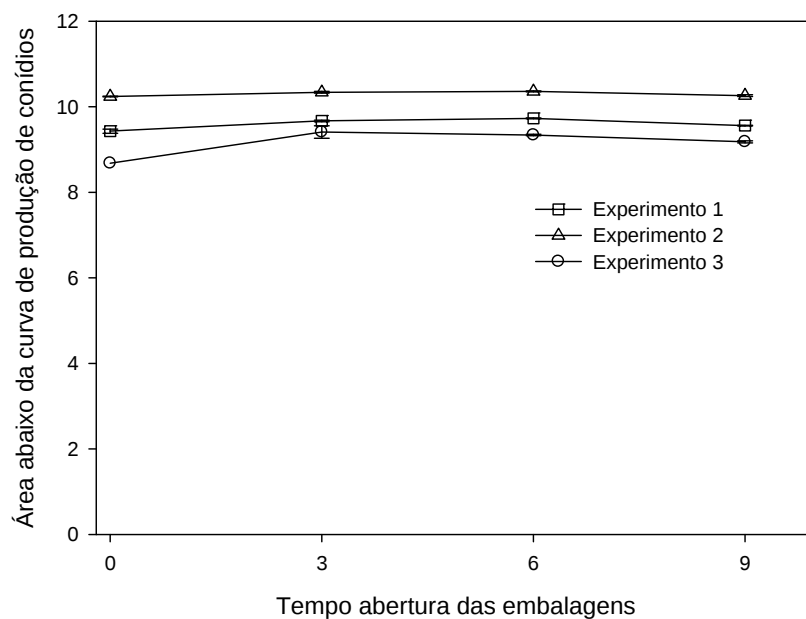


Figura 2 – Área abaixo da curva de produção de *C. rosea* obtida em três experimentos. Os dados foram transformados para Log (esporos). Cada ponto no eixo x representa a média de AAC de cada um dos tratamentos (tempo de abertura do recipiente após colonização do substrato). Médias de três repetições por ponto.

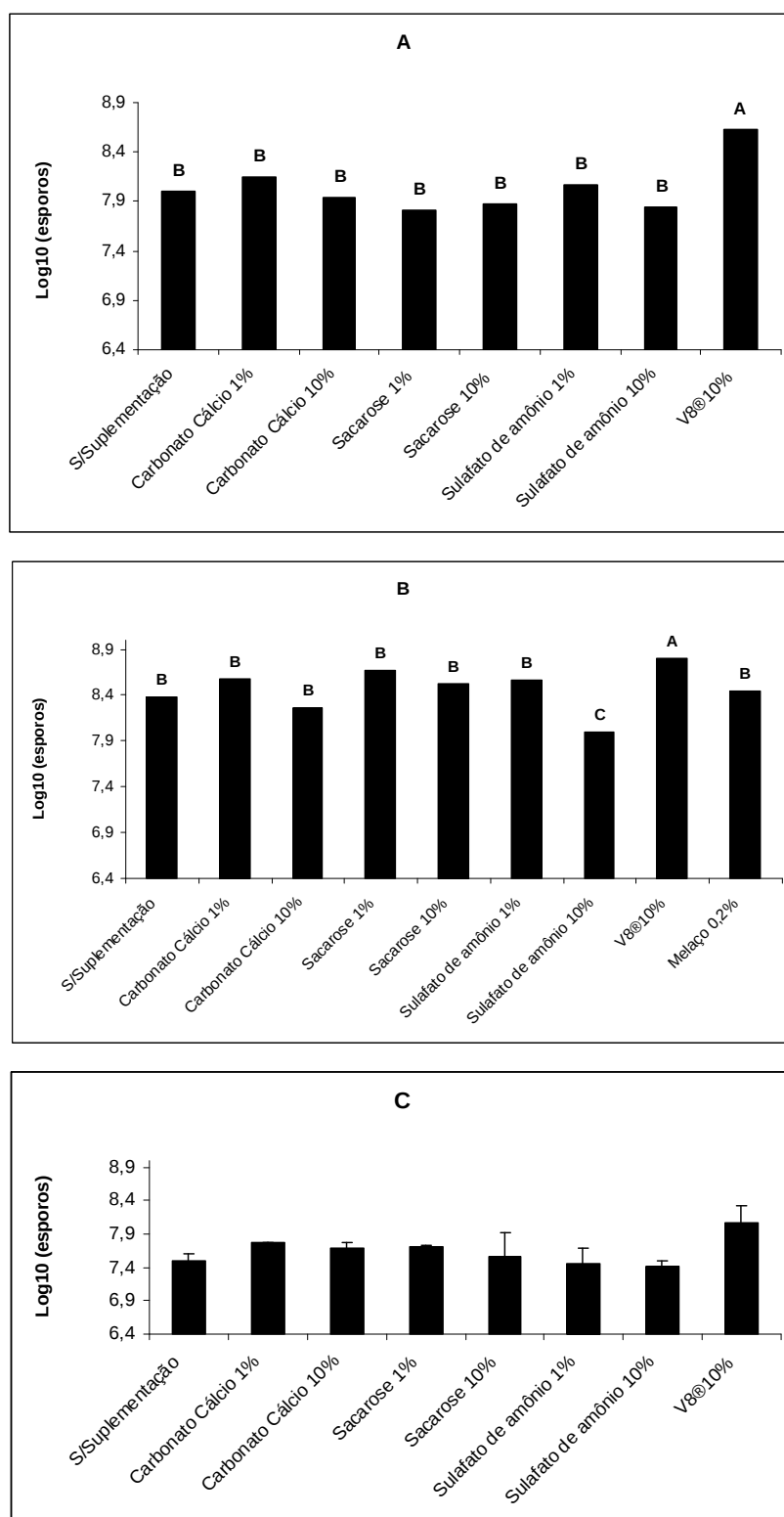


Figura 3 – Produção de esporos de *C. rosea* em função das suplementações em arroz no experimento 1 (A), experimento 2 (B) e palha de soja (C). Incubação a 24°C, fotoperíodo de 12. Avaliação após 30 dias. Em A e B, Barras seguidas com a mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Em C, barras verticais menores representam o erro padrão. Médias de três repetições.

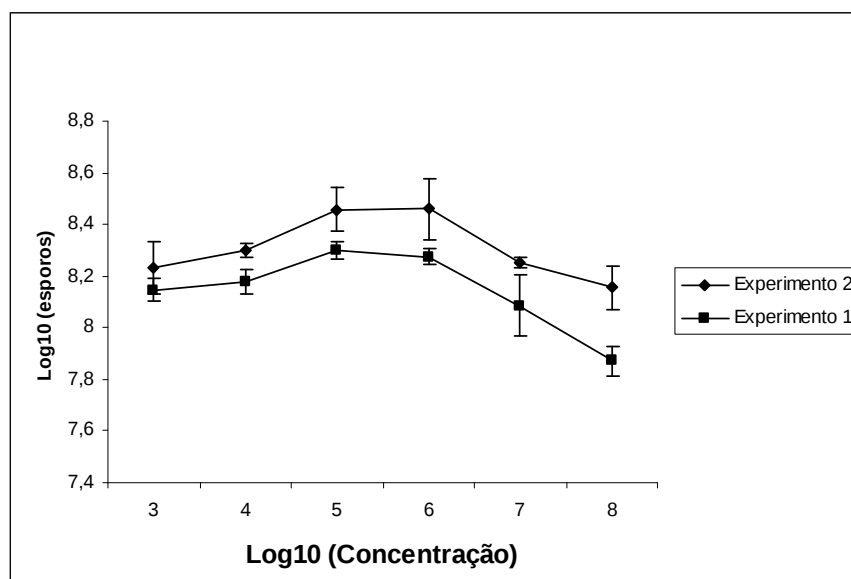


Figura 4 – Produção de esporos de *C. rosea* em diferentes concentrações iniciais (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8). Incubação a 24°C, fotoperíodo de 12h, avaliação após 30 dias. Barras verticais representam o erro-padrão. Médias de quatro repetições. (n=4).

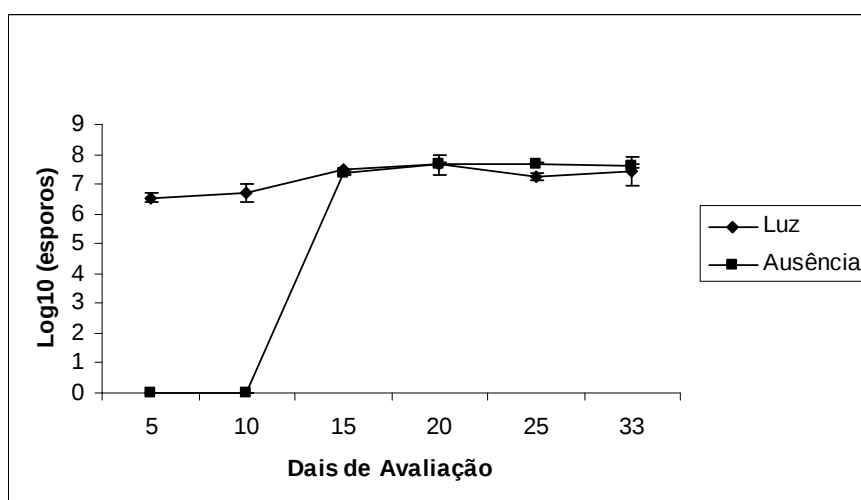


Figura 5 – Produção de esporos sob diferentes regimes de luz (ausência de luz e fotoperíodo de 12h), avaliada aos 5, 10, 15, 20, 25 e 33 dias. Incubação a 24°C. Barras verticais representam o erro-padrão. Médias de três repetições.

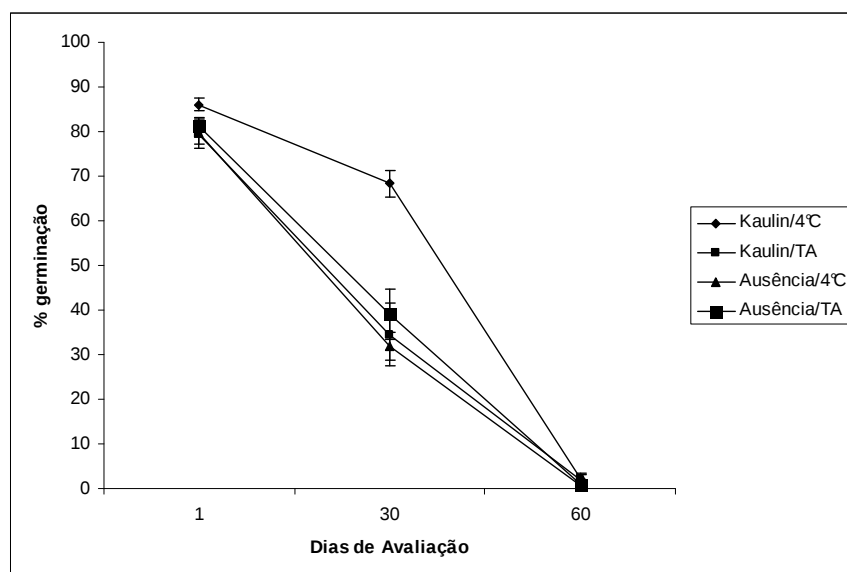


Figura 6 – Germinação de esporos ao longo do tempo, mantidos em grãos triturados. Barras verticais representam o erro-padrão. Médias de três repetições.