

EUGÊNIO CHAVES

**SOBREVIVÊNCIA DE ESCLERÓDIOS DE *Sclerotinia sclerotiorum*
EM SOLO, COM APLICAÇÃO DE *Clonostachys rosea***

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011**

EUGÊNIO CHAVES

**SOBREVIVÊNCIA DE ESCLERÓDIOS DE *Sclerotinia sclerotiorum*
EM SOLO, COM APLICAÇÃO DE *Clonostachys rosea***

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

APROVADA: 27 de Julho de 2011

Prof. Fabrício de Ávila Rodrigues

Pesq. Trazilbo José de Paula Júnior

**Prof. Luiz Antonio Maffia
(Orientador)**

Ofereço

A todos que torceram por mim.

A Deiziane pelo carinho.

Dedico

A todos os meus familiares.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Em especial, aos meus pais, Gercina das Graças Chaves e José Marinho Chaves pelo carinho, luta, esforço e dedicação na minha caminhada ao longo de toda minha vida. Aos meus irmãos, Alexandre, Giovani, Patrícia, José Humberto e Rogério, pelo apoio, confiança e amor e a Aida, Decalaff e Lorena e meus sobrinhos Maria Eduarda, Vinícius, Thiago, Pedro e Enzo pelo carinho e amizade. A Deiziane pelo carinho, amor e compreensão durante todo o tempo em que estivemos juntos.

Ao professor Luiz Antônio Maffia, pela orientação, confiança, amizade e paciência durante todo esse tempo em que estive presente desde como estagiário.

A Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Fitopatologia e à Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade, estrutura e pelo apoio financeiro.

Aos Professores do Departamento de Fitopatologia que contribuíram para minha formação durante esse período.

A toda equipe de Pós-Graduação e Graduação do Laboratório de Epidemiologia e Controle Biológico pela amizade, confiança, descontração, auxílio e esforço, em especial a Helton e Filipe Borel, que ajudaram na execução dos experimentos, a Ricardo Brainer pelos ensinamentos e apoio durante a graduação.

A todos que direto ou indiretamente me auxiliaram durante esse tempo.

BIOGRAFIA

Eugênio Chaves, filho de José Marinho Chaves e Gercina das Graças Chaves, nasceu em 15 de maio de 1983, em Pará de Minas, Estado de Minas Gerais.

Em 2004, ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa (MG), onde graduou-se em julho de 2009.

Em Julho do mesmo ano, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa.

Sumário

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Controle biológico.....	3
2.2 <i>Coniothyrium minitans</i>	4
2.3 <i>Trichoderma</i> spp.....	5
2.4 <i>Clonostachys rosea</i>	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Procedimentos gerais.....	10
3.2 Sobrevivência de escleródios em diferentes estádios e em presença de <i>Clonostachys rosea</i> , em diferentes condições de solo.....	11
3.3 Sobrevivência de escleródios e de <i>Clonostachys rosea</i> , em diferentes condições de solo e níveis de temperatura	12
3.4 Sobrevivência de escleródios e de <i>Clonostachys rosea</i> , em diferentes condições de solo e níveis de umidade do solo	13
3.5 Sobrevivência de escleródios e de <i>Clonostachys rosea</i> , em diferentes condições de solo com diferentes concentrações de conídios do antagonista.....	13
3.6 Sobrevivência de escleródios e de <i>Clonostachys rosea</i> , em diferentes proporções de substrato	14
4. RESULTADOS.....	15
4.1 Sobrevivência de escleródios em diferentes estádios e de <i>Clonostachys</i> <i>rosea</i> , em diferentes condições de solo	15
4.2 Sobrevivência de escleródios e de <i>Clonostachys rosea</i> , em diferentes condições de solo e níveis de temperatura	16
4.3 Sobrevivência de escleródios e de <i>Clonostachys rosea</i> , em diferentes condições de solo e níveis de umidade do solo	16

4.4	Sobrevivência de escleródios e de <i>Clonostachys rosea</i> , em diferentes condições de solo com diferentes concentrações de conídios do antagonista.....	17
4.5	Sobrevivência de escleródios e de <i>Clonostachys rosea</i> , em diferentes proporções de substrato orgânico	17
5.	DISCUSSÃO.....	18
6.	CONCLUSÕES.....	23
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

RESUMO

CHAVES, Eugênio, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011.
Sobrevivência de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* em solo, com aplicação de *Clonostachys rosea*. Orientador: Luiz Antônio Maffia.

Sclerotinia sclerotiorum causa o mofo branco, podridão da haste, podridão aquosa ou podridão branca, doença importante em várias culturas como feijão, soja, algodão, tomate e ervilha. O patógeno produz escleródios que podem sobreviver no campo por vários anos, o que dificulta seu controle. Na perspectiva de avaliar o biocontrole no manejo do mofo branco, testou-se a eficiência de *Clonostachys rosea*, em parasitar escleródios do patógeno e reduzir a viabilidade dos mesmos. Estudou-se *in vitro* a sobrevivência de escleródios dormentes e condicionados para germinação miceliogênica, em solo natural, pasteurizado e autoclavado, em diferentes níveis de umidade e temperatura, e infestados com concentrações variadas de conídios de *C. rosea*. A temperatura, umidade, estádios do escleródio e concentração de conídios do antagonista não interferiram na germinação dos escleródios. *Clonostachys rosea* inibiu a germinação dos escleródios apenas no solo autoclavado, independentemente do fator estudado. Não se detectou interferência da umidade, temperatura do solo e concentração de conídios em recuperar o antagonista do solo. Apesar de *C. rosea* não haver afetado a viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum* em solos natural e pasteurizado, reduziu marcadamente a viabilidade em solo autoclavado. Credita-se a baixa competitividade do antagonista, e conseqüentemente baixa eficiência no parasitismo, à inexistência de fonte externa de nutrientes para auxiliar seu estabelecimento nos solos natural e pasteurizado. Sugerem-se novos trabalhos, para se avaliar a eficácia dessas fontes, principalmente em solos em condições naturais.

ABSTRACT

CHAVES, Eugênio, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2011. **Survival of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in the soil, with application of *Clonostachys rosea*.** Adviser: Luiz Antônio Maffia.

Sclerotinia sclerotiorum causes white mold, stem rot, watery rot and white rot disease in many important crops such as bean, soybean, cotton, tomato, and pea. The pathogen produces sclerotia that can survive in the field for several years, which hinders white mold control. In the perspective of assessing biocontrol in the management of the disease, we tested the efficiency of *Clonostachys rosea* in parasitizing sclerotia of the pathogen and reducing their viability. Thus, we studied *in vitro* the survival of sclerotia either dormant or conditioned to myceliogenic germination in soil samples that were untreated, pasteurized, or autoclaved, at different levels of both moisture and temperature, and infested with varying conidia concentrations of *C. rosea*. Temperature, moisture, stages of sclerotia, and conidia concentration did not affect the germination of sclerotia. *Clonostachys rosea* inhibited germination of sclerotia only in the autoclaved soil. Moisture, temperature, and conidia concentration had no effect in the recovery of *C. rosea* from soil. Although *C. rosea* have not affected the viability of sclerotia of *S. sclerotiorum* in untreated and pasteurized soils, it markedly reduced sclerotia viability in the autoclaved soil. The low competitiveness of *C. rosea*, and consequently its low efficiency in parasitism, is credited to the absence of external nutrient sources to support its establishment in both untreated and pasteurized soils. New studies to evaluate the effectiveness of these sources, particularly in soils under natural conditions, are suggested.

1. INTRODUÇÃO

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary, agente causal do mofo branco, é patógeno importante, de distribuição mundial, ampla gama de hospedeiros e de controle difícil (Boland & Hall, 1994; Willetts & Wong, 1980). O fungo tem hospedeiros em várias famílias botânicas (Willetts & Wong, 1980): há relatos de mais de 400 espécies de plantas, cultivadas ou não, incluídas em cerca de 75 famílias e 278 gêneros, como hospedeiras (Boland & Hall, 1994). Em vista dessa gama de hospedeiros, considera-se *S. sclerotiorum* como um dos principais fungos fitopatogênicos (Willetts & Wong, 1980). Outros fatores que dificultam o controle do patógeno incluem a ausência de cultivares resistentes, a produção de escleródios que podem permanecer viáveis no campo por vários anos, o número elevado de ascósporos produzidos e os problemas associados dos fungicidas (Steadman, 1983).

No Brasil, o primeiro registro da ocorrência de *S. sclerotiorum* foi em batateira, no Estado de São Paulo, em 1921 (Chaves, 1964; Homechin, 1982). Com a expansão da fronteira agrícola para a região dos Cerrados, e com o plantio no período frio e seco do ano, o mofo branco tornou-se importante no Brasil, onde causa perdas consideráveis em várias culturas, principalmente nas de feijão, soja, hortaliças e tomate industrial. A importância da doença vem crescendo na cultura da soja, em virtude do plantio continuado no mesmo local e/ou da rotação de culturas com espécies suscetíveis, como ervilha, feijão, tomate, algodão e batata (Garcia, 2008).

Perdas causadas pela doença atingem em média 30%, mas podem alcançar 100%, sem a adoção de medidas de controle (Santos et al., 1990). Em 1975, no sul do Paraná, constataram-se perdas de até 70% em lavouras de soja (Ferreira et al., 1981). Em Minas Gerais, ocorreram perdas de 85 a 100 % em cultivos de feijão (Santos & Dhingra, 1989). Em 1990, 51,7% das áreas irrigadas com pivô no Distrito Federal, estavam infestadas. No cerrado brasileiro, observaram-se perdas de 60% em feijoeiros (Charchar et al., 1991).

O patógeno invade os tecidos do hospedeiro, causa podridão aquosa e forma um micélio branco cotonoso, de onde originam-se os escleródios. Os restos culturais decompõem-se no solo, onde os escleródios podem permanecer dormentes por cerca de 8 anos (Steadman, 1983; Adams & Ayers, 1979) ou germinar, quando as condições tornam-se favoráveis (Bolton et al., 2006; Dow et al., 1988; Willetts & Wong, 1980; Purdy, 1979). A germinação pode ser miceliogênica ou carpogênica, dependendo das

condições ambientais, principalmente temperatura e umidade (Clarkson et al., 2004; Huang et al., 1998; Huang & Kozub, 1989; Morrall, 1977; Cook et al., 1975). Na germinação miceliogênica, há produção de hifas que infectam diretamente a planta, causando podridão da coroa e podridão de raízes (Bardin & Huang, 2001; Finlayson et al., 1989; Holley & Nelson, 1986; Le Tourneau, 1979). Na germinação carpogênica, há formação de apotécios e produção de número elevado de ascósporos. A maioria dos ascósporos deposita-se no campo onde foi produzida (Wegulo et al., 2000), e alguns são dispersos pelo vento a longas distâncias (Li et al., 1994).

Em geral, as medidas de controle do mofo branco objetivam reduzir a quantidade de inóculo no campo. Pode-se reduzir a quantidade de escleródios viáveis, inundando-se o solo por 20 a 45 dias o que, na maioria das vezes é economicamente inviável (Chaves, 1964). Quando aplicados preventivamente (Steadman, 1979), fungicidas controlam parcialmente a doença, mas demanda-se grande número de aplicações durante o cultivo (Willettts & Wong, 1980). Pode-se efetuar o controle cultural, com formação da palhada no sistema de plantio direto, para inibir a formação de apotécios (Ferguson & Shew, 2001; Ferraz et al., 1999). A rotação de cultura não é medida adequada, pois os escleródios sobrevivem no solo por longos períodos e o patógeno tem ampla gama de hospedeiros (Li et al., 2003).

Com a pressão para reduzir o uso de produtos químicos, tem-se buscado alternativas para controle de patógenos, especialmente daqueles que sobrevivem por longo tempo no campo, como *S. sclerotiorum* (Whipps et al., 2007). Uma alternativa é o controle biológico, com agentes que reduzam a viabilidade dos escleródios. Os microrganismos *Coniothyrium minitans*, *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp., *Ulocladium atrum* e *Clonostachys rosea* são eficientes no controle do mofo branco. *Clonostachys rosea*, um fungo cosmopolita, é antagonista eficiente a diversos patógenos, inclusive *S. sclerotiorum* (Sutton et al., 1997). No Brasil, *C. rosea* é eficiente no manejo do mofo cinzento do morangueiro, causado por *Botrytis cinerea* (Cota et al., 2008b), mas ainda não foi avaliado no manejo do mofo branco. Para subsidiar a adoção do biocontrole do mofo branco com *C. rosea*, demanda-se gerar conhecimentos básicos, principalmente relacionados ao efeito do fungo nos diferentes tipos de germinação de escleródios do patógeno. Portanto, objetivou-se estudar a sobrevivência de escleródios de *S. sclerotiorum* em diferentes estádios, no solo, submetido a diferentes níveis de umidade e temperatura, e infestado com concentrações variadas de conídios de *C. rosea*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Controle biológico

Define-se controle biológico como a “redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença por um ou mais organismos, feito naturalmente ou por meio da manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonista, ou pela introdução massal de um ou mais antagonistas” (Baker & Cook, 1974). Em vista da dificuldade de controle de *S. sclerotiorum*, da pressão dos consumidores para reduzir o uso de agrotóxicos e do surgimento de populações resistentes a fungicidas, o controle biológico pode ser alternativa no controle do mofo branco, que tornaria o controle mais estável e sustentável (Fravel, 2005).

O biocontrole de doenças causadas por patógenos do solo, como o mofo branco, é complexo, pois essas doenças ocorrem na rizosfera, onde ocorrem mudanças rápidas, intensa atividade microbiana e altas populações de microrganismos (Handelsman & Stabb, 1996). Essas mudanças são grandes em uma escala pequena de eventos temporais de chuva/seca durante o dia, o que leva a variações no pH, potenciais osmótico e de água e na estrutura das partículas do solo (Handelsman & Stabb, 1996). Para aumentar a eficiência do biocontrole, demanda-se entender o ambiente de interação, bem como os mecanismos de ação de antagonistas e da sua interação com patógenos (Fravel, 2005). O conhecimento da interação é relevante para *S. sclerotiorum*, pois os escleródios são mais suscetíveis a antagonistas quando em pós-germinação (Homechin, 1991).

Vários micoparasitas penetram nos escleródios, como *Coniothyrium minitans* e *Sporidesmium sclerotivorum*, propostos como agentes de biocontrole do patógeno (Melo et al., 2006). Recuperou-se consistentemente *C. minitans* de escleródios, e o fungo tem potencial em reduzir a sobrevivência do patógeno no campo (Huang & Erickson, 2000). Há pelo menos um produto comercial para biocontrole baseado em *C. minitans* (Reeleder, 2004; Del Rio et al., 2002; Jones & Whipps, 2002). O sucesso do controle biológico de patógenos do solo depende da habilidade de os agentes de biocontrole se desenvolverem e se dispersarem no solo, sementes ou outras partes da planta, bem como da habilidade competitiva e/ou do micoparasitismo (Handelsman & Stabb, 1996). A seguir, discutir-se-ão *C. minitans*, *Trichoderma harzianum* e

Clonostachys rosea, espécies de fungos usados no biocontrole.

2.2 *Coniothyrium minitans*

Coniothyrium minitans é micoparasita obrigatório de escleródios de *S. sclerotiorum*, *S. minor*, *S. trifoliorum* e alguns isolados de *Sclerotium cepivorum* e *Botrytis* spp. (Sandys-Winsch et al., 1993). Foi primeiramente isolado de escleródios de *S. sclerotiorum* em 1947 e já foi recuperado do solo em mais de 30 países, em todos os continentes, exceto na Antártida (Sandys-Winsch et al., 1993). O fungo pode sobreviver por vários anos no solo, onde foi eficiente no controle de *S. sclerotiorum*, em casa de vegetação e campo, em várias culturas como alface, salsa, girassol e feijão (Whipps et al., 2007). Também tem sido aplicado em folhas de alfafa e feijoeiro, para prevenir a infecção e para reduzir a sobrevivência de escleródios em rotações de culturas e em restos de culturas. Há evidências de que a eficiência de *C. minitans* possa se reduzir em condições de altas concentrações de inóculo do patógeno, e entender a influência da qualidade e quantidade de inóculo, época de aplicação e fontes de *C. minitans* é necessário para melhorar sua eficácia (Whipps et al., 2007).

Há produtos comerciais à base de *C. minitans* para controle de *S. sclerotiorum*, como “Contans” na Alemanha e “Koni” (Whipps & Lumsden, 2001). Na Alemanha, é registrado para controle de *S. sclerotiorum* em alface, em cultivo protegido, e o nível de controle pode atingir 80% (Huang & Erickson, 2008; Budge et al., 1995). Para os autores, *C. minitans* é o antagonista mais efetivo no controle de *S. sclerotiorum*, em solo natural. A baixa colonização do solo pelo antagonista limita sua aplicação, mas o uso de inóculo em grande quantidade aumenta a chance de contato com os escleródios e, conseqüentemente, aumenta a eficiência de controle (Gerlagh et al., 2003).

No Canadá, de 1999 a 2001, determinou-se o efeito dos resíduos, associados ou não a antagonistas, na supressão da germinação carpogênica de escleródios de *S. sclerotiorum* e controle do mofo-branco do feijoeiro: palha de trevo doce (2,5 toneladas/ha) ou farinha de peixe (0,8 ou 2,5 toneladas/ha) reduziram a germinação carpogênica dos escleródios e a intensidade do mofo-branco (Huang et al., 2005). Para os autores, a adição de *C. minitans*, *Penicillium griseofulvum* ou *Trichoderma virens*, aumentou o controle. Eles concluíram que a alteração do solo com a mistura de substratos e antagonistas é promissora no controle da doença.

Sob flutuações periódicas na temperatura, *C. minitans* sobreviveu por 750 dias em solo não irrigado e por até 150 dias em solo irrigado, entre 4 e 28°C; sobreviveu por 360 dias em solo com 6,3%, 18,5% ou 45,4% de água (p.p⁻¹), entre 30 e 40°C, a sobrevivência dependeu da umidade; entre 45 e 50°C a sobrevivência foi baixa, independentemente da umidade do solo. Para os autores, *C. minitans* pode se adaptar a temperatura do solo e condições de umidade no controle de *S. sclerotiorum*. Na Alemanha, *C. minitans* sobreviveu em solos pasteurizado ou não, e foi eficiente no controle de *S. sclerotiorum* (Whipps & Lumsden, 2001).

2.3 *Trichoderma* spp.

Desde 1930, sabe-se que *Trichoderma* spp. podem ser agentes de biocontrole (Howell, 2003). Essas espécies podem ser isolados de quase todos os solos tropicais e temperados e são fungos de vida livre, comuns no solo e ecossistemas radiculares, oportunistas, não patogênicos a plantas e parasitas de outros fungos (Shoresh et al., 2010; Harman et al., 2004). O uso de *Trichoderma* spp. relaciona-se aos mecanismos de micoparasitismo, antibiose e competição por nutrientes do solo (Shoresh et al., 2010).

De 40 amostras de solo do Rio Grande do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Goiás e Tocantins, obtiveram-se 230 isolados monospóricos de *Trichoderma* spp., 10% dos quais, em testes de pareamento em BDA, foram antagonistas eficientes a *S. sclerotiorum* a 20 °C e a *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, a 25°C (Louzada et al., 2009). Para os autores, de sete isolados observados sob microscópio eletrônico de varredura, nem todos foram hiperparasitas aos patógenos, o que sugere haver outros mecanismos de antagonismo, como antibiose e/ou competição.

Trichoderma harzianum parece ser a espécie mais eficiente como antagonista. O isolado T39, cujo produto comercial é Trichodex 20SP, reduziu a mortalidade de plantas e o progresso do mofo branco em pepino (Elad, 2000). Com aplicação de *T. harzianum* em palhada de *Brachiaria ruziziensis*, em lavouras de soja, o número de apotécios no campo reduziu-se; com o aumento da concentração de *T. harzianum*, aumentou a quantidade de escleródios colonizados (Görge et al., 2009). A eficiência dessa espécie no controle de *S. sclerotiorum* é maior quando os escleródios estão agregados no solo (Bae & Knudsen, 2007). Há vários produtos comerciais à base de *T. harzianum*, como Bioworks (Geneva, NY), Trichodex (Israel), Binab T (Suécia) e

Supresivit (República Theca) (Paulitz & Bélanger, 2001). No Brasil, há alguns produtos usados no controle de *S. sclerotiorum*, como Agrotrich, Agrotrich Plus, Biocerto Trichoderma, Biotrich, Ecogreen, Effetive, Ecotrich, Ecotrich ES, ICB Nutrisolo, Trichodel, Trichodermax EC, Trichonat EF, Trichoplus JCO, Tricovab e Trichodermil (Bettiol et al., 2009).

2.4 *Clonostachys rosea*

Clonostachys rosea (Link Fries) [forma perfeita = *Bionectria ochroleuca*], é micoparasita versátil e destrutivo de fungos patogênicos (Schroers et al., 1999). É um organismo cosmopolita, que ocorre no solo, restos culturais, plantas daninhas e cultivadas, em áreas tropicais, temperadas, sub-árticas, desérticas em diversas regiões do mundo (Schroers, 2001; Sutton et al., 1997). O fungo já foi associado a cistos de *Heterodera* spp., *Globodera* spp. e outros nematóides e a fungos, como *S. sclerotiorum*, *Phymatotrichum omnivorum*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis* spp., *Verticillium* spp., *Aphanomyces euteiches*, *Erysiphe orontii*, *Moniliophthora roreri*, *M. pernicioso*, *Phytophthora palmivora*, *Mycosphaerella pinodes* e *Pythium* spp. (Sutton et al., 1997; Whipps, 1987). No Brasil, há relatos de *C. rosea* atuando como entomopatogênico, afetando hemípteras em cana-de-açúcar (Toledo et al., 2006; Marques et al., 1981).

Clonostachys rosea atua por diferentes mecanismos como antibiose, competição por substrato, competição por nutrientes, indução de resistência e micoparasitismo. Caracterizou-se o gene codificador N-acetyl- β -D-glucosaminidase, *cr-nag1*, que é o primeiro gene quitinolítico descrito para *C. rosea* (Mamarabadi et al., 2009). Os autores verificaram que o antagonista produz enzimas que degradam compostos da parede celular (quitina, glucanos e celulose) e que o fungo inibiu o crescimento micelial de *Fusarium culmorum* e *Pythium ultimum*. Ocorreu alta expressão de *cr-nag1* nas interações *C. rosea* - *F. culmorum*. Apesar de *C. rosea* secretar quitinohidrolases, que atuam na parede celular, na sua interação com *P. ultimum*, obtiveram-se evidências de que o antagonista use outro mecanismo de antagonismo (Mamarabadi et al., 2009).

Competição por nutriente e por espaço são os mecanismo mais estudados. Em morangueiro, *C. rosea* suprimiu em torno de 98% da colonização de folhas, hastes e pétalas por *B. cinerea*, sendo tão eficiente quanto aplicações de *T. viridae* ou captan

(Sutton et al., 1997). Em morangueiro, *C. rosea* foi tão ou mais eficiente no controle de *B. cinerea* que fungicida, e duas aplicações semanais de *C. rosea* foram mais eficientes que uma aplicação semanal de fungicida (Cota et al., 2008a). Em roseiras, *C. rosea* suprimiu a esporulação de *B. cinerea* em torno de 99 % (Cota et al., 2008b; Morandi et al., 2001) e, em estufa comercial sem controle climático, estabeleceu-se em tecidos e reduziu a esporulação do patógeno, sugerindo que a aplicação contínua do antagonista e práticas sanitárias podem reduzir a produção de inóculo de *B. cinerea* e reduzir a incidência do mofo cinzento em botões (Morandi et al., 2003). O antagonista também parasita conidióforos e hifas de *B. cinerea* em folhas remanescentes e reduz a esporulação do patógeno, o que sugere eficiência na supressão do mofo cinzento em sistemas produtivos (Morandi et al., 2001). Sob microscopia de varredura, detectou-se que o parasitismo da hifa e do tubo germinativo de *B. cinerea* ocorreu através da penetração direta da hifa de *C. rosea* sem formação de apressório. Sob microscopia de transmissão, sdetectaram-se ruptura e distanciamento da parede celular do hospedeiro em sítios de penetração, levando à desintegração do citoplasma (Li et al., 2002).

Clonostachys rosea também pode promover o crescimento em plantas. A partir de sementes condicionadas com o antagonista, a emergência de plântulas de cebola e cenoura foi mais rápida e uniforme (Bennett & Whipps, 2008). Os autores testaram *Pseudomonas chlororaphis* MA342, *Pseudomonas fluorescens* CHA0, *C. rosea* IK726d11 e *T. harzianum* T22, em sementes de cenoura e alho, e avaliaram a sobrevivência e o estabelecimento dos antagonistas na rizosfera. Retiraram-se amostras após 2, 4 e 8 semanas do plantio, e recuperaram todos os microrganismos, apesar de haver diferenças na sobrevivência ao longo do tempo: a concentração das bactérias reduziu-se; a população de *T. harzianum* T22 permaneceu constante em cenoura e reduziu em alho; e a população de *C. rosea* IK726d11 aumentou significativamente nas duas culturas (Bennett & Whipps, 2008).

O uso de *C. rosea* pode contribuir no manejo integrado das doenças causadas por fungos que produzem estruturas de resistência, como escleródios. De 20 espécies fúngicas isoladas de escleródios de *Claviceps purpurea*, *C. rosea* e *T. harzianum* tiveram alta atividade micoparasítica para escleródios de *C. purpurea* e de *S. sclerotiorum* (Ondřej et al., 2010). Os autores observaram que a germinação dos escleródios tratados com suspensão de esporos dos dois antagonistas reduziu-se significativamente, o micélio que resultou dos escleródios que germinaram foi

degradado e praticamente não se formaram escleródios. No campo, avaliou-se a viabilidade dos escleródios quanto à localização, idade, profundidade e tratamento com *C. rosea*. No primeiro ano, a viabilidade de escleródios foi alta; que se reduziu no segundo, com alta sensibilidade à atividade microbiana. Escleródios com três anos ou mais não germinaram, sendo degradados no solo. Nos dois primeiros anos, 80% dos escleródios foram degradados por *C. rosea*. *In vitro*, *C. rosea*, *Gliocladium virens*, *Chaetomium globosum* e *C. minitans* parasitaram escleródios de *Sclerotium cepivorum*, agente da podridão branca da cebola, e os escleródios parasitados se deterioraram e não germinaram. Sob microscopia eletrônica, observou-se a colonização da estrutura interna dos escleródios e a região medular estavam progressivamente destruídas, apesar de as células da casca manterem-se relativamente intactas, o que levou à conclusão de que estes fungos têm potencial no biocontrole da doença (Stewart & Harrison, 2007).

Além de reduzir a viabilidade dos escleródios, *C. rosea* pode reduzir doenças causadas por fungos de solo, produtores ou não de escleródios. Avaliaram-se isolados antagonistas a *Sclerotinia spp.* em ensaios de laboratório quanto à capacidade de controlar *S. Minor*; em quatro experimentos de campo (Rabeendran et al., 2006). Os autores avaliaram, no primeiro experimento, oito isolados (*T. hamatum* LU595, LU593 e LU592, *T. virens* LU555 e LU556, *C. minitans* LU112, *C.rosea* LU115 e *T. rossicum* LU596), por meio da incorporação de suspensões de esporos no substrato de plantio de mudas de alface a serem transplantadas em um campo infestado com *S. minor*. *Coniothyrium minitans* LU112 e *T. hamatum* LU593 reduziram a doença entre 29 e 91%, controle equivalente ou superior ao do fungicida carbendazim. Ambos os isolados colonizaram efetivamente a rizosfera; *C. rosea* LU115 e *T. rossicum* LU596 reduziram a doença entre 89 a 100%, mas não foram eficientes no controle da doença na colheita. O complexo de podridão radicular de ervilha, causado por *Alternaria alternata*, *Aphanomyces euteiches*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*, *F. solani* f. sp. *pisi*, *Mycosphaerella pinodes*, *Pythium spp.*, *Rhizoctonia solani*, e *S. sclerotiorum*, é fator limitante à produção no Canadá (Xue, 2003a). Segundo os autores, o isolado ACM941 de *C. rosea* pode parasitar micélio de *S. sclerotiorum* no solo; quando aplicado em sementes, o antagonista colonizou o tegumento, hipocótilo e raízes, reduziu significativamente a infecção de sementes, aumentou a germinação e emergência e reduziu a severidade da podridão radicular em 76%. O efeito da aplicação do antagonista foi similar ao de Thiram. Os autores observaram a interação

das hifas de *C. rosea* e dos patógenos, sendo que o antagonista atuava principalmente pelo entrelaçamento e ocasionalmente penetrava na hifa dos patógenos. Em experimento de campo no Canadá, avaliou-se a eficiência do isolado ACM941 de *C. rosea*, dois produtos comerciais à base do mesmo antagonista (ACM941-Pro e GB116) e Thiram 75WP no controle do complexo de podridão radicular da ervilha (Xue, 2003a). Para o autor, os efeitos sobre a emergência das plântulas, a severidade da podridão radicular e produtividade variaram entre os anos. A combinação de *C. rosea* ACM941 e Thiram 75WP foi o tratamento mais eficaz, e aumentou a emergência em 17,4%. Desenvolveu-se um produto comercial à base desse isolado; a aplicação do produto aumentou a emergência em 17,1% e reduziu a podridão radicular em 29,6% (Xue, 2003a).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Realizaram-se os trabalhos na Unidade de Controle Biológico e nas câmaras de crescimento do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

3.1 Procedimentos gerais

O solo usado nos experimentos, Latossolo Vermelho Amarelo (pH = 5,09), com curva de retenção de água de: 31,3% w/w (Capacidade de Campo; - 0,01Mpa) e 18,6% w/w (Ponto de Murcha Permanente; - 1,5 Mpa), e teor de matéria orgânica de 3,16 dag/kg (3,16%), foi seco à temperatura ambiente por 2 – 3 dias, passado em peneiras de 2 mm (Huang & Erickson, 2008) e mantido em frascos à temperatura ambiente até ser submetido aos tratamentos (esterilizado, pasteurizado e natural). Para o solo esterilizado, autoclavaram-se as amostras por duas vezes a 121°C (0,1 MPa) por 30 min. As autoclavagens foram em dias consecutivos, e a segunda ocorreu um dia antes da montagem do experimento (Huang & Erickson, 2008). Para o solo pasteurizado, tratou-se o solo a 80°C por 3 min, no dia anterior ao da montagem do experimento. O solo natural foi aquele mantido sem qualquer tratamento térmico, em condições de temperatura ambiente em frascos (Bennett et al., 2006).

Os escleródios de *S. sclerotiorum* originais usados nos experimentos, cedidos pela EPAMIG – Viçosa, provieram de campos de soja e de feijão infestados. Esses escleródios foram transferidos para meio de batata-dextrose-ágar (BDA), em placas de Petri, mantendo-se a 20°C sob luz branca fluorescente contínua. Após uma semana, retiraram-se discos de micélio, que foram depositados em grãos de trigo autoclavados (25 g de grãos de trigo, 50 ml de água destilada, autoclavado a 121°C por 15 min) em sacos de plástico autoclavável, incubando-se a 20°C, fotoperíodo de 24 h, com agitação diária, para promover dispersão do micélio (Clarkson et al., 2007; Bennett et al., 2006; Bennett et al., 2005; Young et al., 2004; Jones et al., 2003). Após 4 semanas, retiraram-se os escleródios, que foram lavados em água destilada estéril, secos ao ar, desinfestados em solução de hipoclorito de sódio (1,0%) por 5 min, lavados três vezes em água destilada estéril, secos ao ar em câmara de fluxo (Peres et al., 2002) e guardados em frascos a 4°C, até serem usados nos experimentos (Bennett et al., 2006; Peres et al., 2002). A partir desses escleródios, produziram-se outros, em três estádios

(dormentes, condicionados para germinação miceliogênica e condicionados para germinação carpogênica). Os dormentes foram extraídos após 3 semanas de incubação, a 20°C, sob luz fluorescente contínua. Os condicionados para germinação carpogênica foram extraídos após 8 semanas de incubação a 10°C, no escuro. Os condicionados para germinação miceliogênica foram extraídos após 7 semanas de incubação, sendo 3 semanas a 20°C, sob luz fluorescente contínua, e 4 semanas a -20°C, no escuro (Huang & Erickson, 2008).

Usou-se a mistura de isolados brasileiros de *C. rosea*: NCR19/F, NCR60/F, NCR61/F e NCR62/F (Nobre et al., 2005). Cultivou-se cada isolado em BDA em tubos de vidro a 25°C, fotoperíodo de 12 h. Após 10 dias, removeram-se os conídios com bastão de vidro, pela suspensão em água destilada estéril, filtrou-se em dupla camada de gaze e, com um hemacitômetro, ajustou-se a concentração da suspensão para 10^7 conídios/ml (Cota et al., 2008b). Misturaram-se volumes iguais de suspensão de cada isolado. Referir-se-á à mistura como suspensão de conídios.

Executou-se cada um dos experimentos descritos a seguir por duas vezes, em delineamento inteiramente casualizado. Em todos os experimentos, considerou-se como uma unidade experimental uma placa de Petri (9 cm de diâmetro) com cada tratamento. Realizaram-se todas as análises estatísticas com o Programa SAS v 9.2.

3.2 Sobrevivência de escleródios em diferentes estádios e em presença de *Clonostachys rosea*, em diferentes condições de solo

Estudou-se a sobrevivência de escleródios dormentes, condicionados para germinação carpogênica e condicionados para germinação miceliogênica, nas três condições do solo (esterilizado, pasteurizado e natural) com aplicação de *C. rosea* ou água destilada estéril.

Executaram-se dois experimentos para avaliar o efeito de *C. rosea* na germinação, com escleródios. No primeiro, usaram-se escleródios dormentes e escleródios condicionados para germinação miceliogênica. No segundo, usaram-se escleródios dormentes e escleródios condicionados para germinação carpogênica. Cada experimento foi em esquema fatorial, com cinco repetições.

Em ambos os experimentos, enterraram-se dez escleródios a 1 cm por placa de Petri com 45 g de solo em cada condição e adicionaram-se 4,5 ml da suspensão de esporos de *C. rosea*. Ajustou-se a umidade para próximo da capacidade de campo

(31,3% de umidade, equivalente a -0,01MPa). Selaram-se as placas com Parafilm™, mantendo-se em incubadora, a 20°C, sob luz fluorescente contínua (Huang & Erickson, 2008). Semanalmente, aferiu-se o peso de cada placa e, quando necessário, adicionava-se água destilada estéril para manter a umidade constante (Huang & Erickson, 2008).

No experimento 1, após seis semanas de incubação, desenterraram-se os escleródios, que foram desinfestados (álcool 70% por 30 s e solução de hipoclorito de sódio 2,0% por 5 min), lavados três vezes em água destilada estéril, secos ao ar, na câmara de fluxo (Peres et al., 2002), e plaqueados em BDA sintético com sulfato de estreptomicina (0,2 g/l de meio). Avaliou-se a viabilidade dos escleródios, após 10 dias de incubação a 20°C sob luz fluorescente contínua (Huang & Erickson, 2008). Considerou-se viável o escleródio do qual se originava crescimento micelial (Wu et al., 2008).

No experimento 2, após três semanas de incubação, avaliou-se a viabilidade dos escleródios condicionados para germinação carpogênica, pela produção de apotécios, e a viabilidade dos escleródios dormentes, pela produção de micélio. Realizou-se o experimento por quatro vezes.

Em ambos os experimentos, avaliou-se, também, a sobrevivência de *C. rosea*. Para tal, assepticamente, de cada placa retirou-se 1g de solo, misturando-se em 10 ml de água destilada estéril por 1 min, deixando-se em repouso. Após 4 min, efetuou-se diluição em série em água destilada estéril até 10^{-4} , em meio seletivo para *C. rosea* em placas (Park et al., 1992). Após 7 dias de incubação, no escuro a 20°C, calculou-se o número de unidades formadoras de colônia (ufc) (com intervalo de 30 – 300 colônias), a partir da contagem de três placas por diluição (Bennett et al., 2003; Xue, 2003a).

3.3 Sobrevivência de escleródios e de *Clonostachys rosea*, em diferentes condições de solo e níveis de temperatura

Estudou-se a sobrevivência do patógeno e do antagonista no solo nas três condições, em cinco níveis de temperatura (14, 18, 22, 26 e 30°C) com aplicação de *C. rosea* ou água destilada estéril.

Em cada placa, adicionaram-se 70 g de solo, enterraram-se dez escleródios dormentes a 1 cm, adicionaram-se 7 ml da suspensão de conídios de *C. rosea*,

ajustou-se a umidade do solo como descrito no item 3.2, selou-se com Parafilm. Mantiveram-se as placas a 14, 18, 22, 26 e 30°C, no escuro (Huang & Erickson, 2008; Hao et al., 2003). Como descrito no item 3.2, avaliaram-se a viabilidade dos escleródios, por meio da germinação miceliogênica, e a sobrevivência de *C. rosea*.

O experimento foi em esquema fatorial (três condições do solo x cinco níveis de temperatura) com três repetições.

3.4 Sobrevivência de escleródios e de *Clonostachys rosea*, em diferentes condições de solo e níveis de umidade do solo

Estudou-se a sobrevivência do patógeno e do antagonista no solo nas três condições, com cinco níveis de umidade (18,6; 21,78; 24,95; 28,13 e 31,30% w/w) com aplicação de *C. rosea* ou água destilada estéril.

Em cada placa de Petri, adicionaram-se 70 g solo, enterraram-se dez escleródios dormentes a 1 cm, e adicionaram-se 7 ml da mistura de suspensões de conídios de *C. rosea*. Para atingir cada nível desejado de umidade, adicionou-se água destilada estéril. Os demais procedimentos foram como em 3.3.

O experimento foi em esquema fatorial (três tipos de solo x cinco níveis de umidade) com três repetições.

3.5 Sobrevivência de escleródios e de *Clonostachys rosea*, em diferentes condições de solo com diferentes concentrações de conídios do antagonista

Estudou-se a sobrevivência do patógeno e do antagonista no solo nas três condições, com cinco níveis de concentração de *C. rosea* (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 conídios/ml) com aplicação de *C. rosea* ou água destilada estéril (Bennett et al., 2003).

Em cada placa de Petri, adicionaram-se 70 g de solo, enterraram-se dez escleródios dormentes a 1 cm, adicionaram-se 7 ml da suspensão de conídios de *C. rosea* em cada concentração, e ajustou-se a umidade para 31,3% (w/w; -0,01MPa), adicionando-se água destilada estéril. Os demais procedimentos foram como em 3.3.

O experimento foi em esquema fatorial (três condições de solo x cinco concentrações de *C. rosea*) com três repetições.

3.6 Sobrevivência de escleródios e de *Clonostachys rosea*, em diferentes proporções de substrato

Estudou-se a sobrevivência do patógeno e do antagonista em mistura de solo natural e substrato, com diferentes proporções de substrato (0, 25, 50, 75 e 100%), com aplicação de *C. rosea* ou água destilada estéril. O substrato usado no experimento, Tropstrato Hortaliça (HT) (Vidaderde), com teor de matéria orgânica de 38,83%, foi passado em peneiras de 2 mm e mantido a temperatura ambiente até seu uso. Usou-se o substrato natural, ou seja, sem qualquer tratamento.

Em cada placa de Petri, adicionaram-se 45 g da mistura de solo e substrato, enterraram-se dez escleródios dormentes a 1 cm, adicionaram-se 4,5 ml da suspensão de conídios de *C. rosea*, e ajustou-se a umidade para 31,3% (w/w; -0,01MPa), adicionando-se água destilada estéril. Os demais procedimentos foram similares aos adotados no item 3.3.

4. RESULTADOS

Pelo teste de Levene, detectou-se homogeneidade das variâncias entre as duas execuções, para os experimentos relacionados à sobrevivência de escleródios e descritos em 4.1 (P = 0,78), 4.2 (P = 0,92), 4.3 (P = 0,80), 4.4 (P = 0,65) e 4.5 (P = 0,31), bem como para os relacionados à população de *C. rosea* e descritos em 4.1 (P = 0,18), 4.3 (P = 0,10) e 4.4 (P = 0,079). Portanto, analisaram-se conjuntamente os resultados das duas execuções de cada experimento.

Nas análises dos experimentos, transformaram-se os dados de germinação de escleródios para arco[seno(raiz quadrada da germinação)] e os de população de *C. rosea*, de ufc para log(ufc), para atender às pressuposições da análise de variância.

4.1 Sobrevivência de escleródios em diferentes estádios e de *Clonostachys rosea*, em diferentes condições de solo

Quanto à germinação de escleródios, houve efeito significativo da interação *C. rosea* e condição de solo (P < 0,0001). No solo autoclavado, houve efeito significativo na aplicação de *C. rosea* (P < 0,0001). A média de germinação dos escleródios foi menor na presença de *C. rosea* (0%) que na ausência (98%).

A germinação dos escleródios dormentes e não diferiu significativamente da dos condicionados para germinação miceliogênica, nas três condições do solo (P = 0,33). Não houve efeito significativo da aplicação de *C. rosea* na germinação dos escleródios, nos solos pasteurizado e natural (P = 0,95 e P = 0,22, respectivamente). Na ausência de *C. rosea*, não houve diferença quanto à germinação dos escleródios em todas as condições de solo (Figura 1).

Recuperou-se *C. rosea* apenas do solo autoclavado. Houve diferença significativa entre a germinação dos escleródios dormentes e a dos escleródios condicionados para germinação miceliogênica (P < 0,0001). A população de *C. rosea* foi maior em solo com escleródios dormentes que em solo com escleródios condicionado para germinação miceliogênica (equivalentes a $1,72 \times 10^5$ e $5,44 \times 10^4$ ufc/g solo, respectivamente).

Mesmo executando-se o experimento 2 (escleródios dormentes e condicionados para germinação carpogênica) por quatro vezes, não ocorreu germinação carpogênica.

Assim, não se obtiveram dados da germinação nem da sobrevivência de *C. rosea*.

4.2 Sobrevivência de escleródios e de *Clonostachys rosea*, em diferentes condições de solo e níveis de temperatura

A temperatura não afetou a germinação dos escleródios ($P = 0,50$). No solo autoclavado, houve efeito significativo da aplicação de *C. rosea* ($P < 0,0001$), e a germinação de escleródios de *S. sclerotiorum* foi nula na presença (0%), e alta na ausência do antagonista (93%). Nos solos pasteurizado e natural, não houve efeito da temperatura nem da presença de *C. rosea* na germinação dos escleródios (Figura 2).

Na sobrevivência de *C. rosea*, não houve homogeneidade das variâncias entre as duas execuções do experimento, pelo teste de Levene ($P = 0,0002$), e se analisou cada execução separadamente. Recuperou-se o antagonista, em todos os níveis de temperatura, apenas no solo autoclavado. A temperatura não afetou a sobrevivência de *C. rosea* ($P = 0,29$ e $P = 0,12$, na 1ª e 2ª execuções, respectivamente) (Figura 3).

Na primeira execução do experimento, recuperou-se o antagonista do solo pasteurizado, mantido a 14°C. A média de recuperação foi significativamente maior no solo autoclavado ($P = 0,01$), com $7,6 \times 10^3$ ufc/g solo do que no pasteurizado com $3,63 \times 10^3$ ufc/g solo. Na segunda execução, recuperou-se o antagonista dos solos pasteurizado e natural, também quando mantidos a 14°C. A população final de *C. rosea* não diferiu entre as três condições de solo ($P = 0,10$).

4.3 Sobrevivência de escleródios e de *Clonostachys rosea*, em diferentes condições de solo e níveis de umidade do solo

Os níveis de umidade não afetaram a germinação dos escleródios, em todas as condições do solo ($P = 0,53$). No solo autoclavado, houve efeito significativo da aplicação de *C. rosea* ($P < 0,0001$), e a germinação de escleródios foi inibida na presença do antagonista (0%), enquanto que na ausência, a germinação foi alta (89%). Nas demais condições, a germinação foi alta (acima de 90%) (Figura 4).

Na sobrevivência de *C. rosea*, recuperou-se o antagonista apenas do solo autoclavado. A umidade não afetou a sobrevivência de *C. rosea* ($P = 0,10$) (Figura 5).

4.4 Sobrevivência de escleródios e de *Clonostachys rosea*, em diferentes condições de solo com diferentes concentrações de conídios do antagonista

As diferentes concentrações de conídios de *C. rosea* não afetaram a germinação de escleródios de *S. sclerotiorum* nas três condições do solo ($P = 0,65$). No solo autoclavado, a germinação dos escleródios de *S. sclerotiorum* foi nula na presença de *C. rosea*, independentemente da concentração. A germinação foi alta (acima de 90%) nos solos pasteurizado (99,7%) e natural (96,9%), não diferindo da germinação na presença do antagonista. Na ausência de *C. rosea*, não houve efeito da condição do solo na germinação dos escleródios ($P = 0,17$).

Na sobrevivência de *C. rosea*, recuperou-se o antagonista apenas do solo autoclavado. A concentração de conídios de *C. rosea* aplicado no solo não teve efeito na população final do antagonista ($P = 0,079$) (Figura 6).

4.5 Sobrevivência de escleródios e de *Clonostachys rosea*, em diferentes proporções de substrato orgânico

A proporção de substrato não afetou a germinação dos escleródios no solo ($P = 0,16$). A germinação dos escleródios foi alta (acima de 95%), adicionando-se ou não o antagonista ao solo, e foi similar à germinação sem a adição do antagonista.

Na sobrevivência de *C. rosea*, em meio seletivo não se recuperou o antagonista, independentemente da proporção de substrato.

5. DISCUSSÃO

O mofo branco pode causar perdas de até 100% em várias culturas importantes (Santos et al., 1990). O controle da doença é difícil, pois *S. sclerotiorum* produz escleródios que permanecem viáveis por mais de 8 anos no solo, tem ampla gama de hospedeiros e ampla adaptabilidade climática. Ademais, o controle químico é pouco eficiente (Chitarra, 2008; Leite, 2005). Em vista desses aspectos, buscaram-se novas alternativas de manejo da doença, como o controle biológico. Assim, estudou-se a eficiência de *C. rosea* em inibir a germinação de escleródios de *S. sclerotiorum*.

Em todos os experimentos, *C. rosea* reduziu a germinação dos escleródios de *S. sclerotiorum* apenas no solo autoclavado. Assim, infere-se que houve redução da viabilidade de escleródios, apenas quando *C. rosea* se estabeleceu no solo. No solo autoclavado, não havia microrganismos que pudessem competir com o antagonista, o que facilitou seu estabelecimento, e se observaram colônias agregadas do fungo sobre o solo, onde se enterraram os escleródios. Em algumas placas do solo pasteurizado, observaram-se pequenas colônias de *C. rosea* onde os escleródios estavam enterrados, mas não se recuperou o antagonista. Provavelmente, para se estabelecer no solo, *C. rosea* demanda uma fonte exógena de nutrientes, que pode ser fornecida pelos escleródios. Como se adicionaram os conídios em suspensão, sem quaisquer nutrientes, o antagonista não se estabeleceu eficientemente. Portanto, os conídios poderiam ser incorporados associados a uma fonte de nutrientes, como os grãos de arroz usados como substrato, para que o antagonista se estabelecesse no solo e colonizasse os escleródios. Similarmente, quando se incorporou suspensão de conídios de *C. minitans* no solo, a viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum* não foi reduzida, mas quando se adicionou substrato sólido de farinha de milho colonizada pelo antagonista, a viabilidade de escleródios reduziu-se (Jones & Whipps, 2002). Estudos futuros devem priorizar o efeito da incorporação de fontes de nutrientes, associados a conídios de *C. rosea*, para favorecer o antagonismo a *S. sclerotiorum* no solo. Nessa perspectiva, incorporou-se substrato orgânico, em diferentes proporções, ao solo natural para simular a adição de matéria orgânica, mas sem redução da viabilidade dos escleródios. Acredita-se que os isolados de *C. rosea* testados não competiram eficientemente com outros microrganismos no solo. Na presença de plantas, *C. rosea* colonizou a rizosfera, cresceu em direção às hifas de *S. sclerotiorum*, ocorrendo o entrelaçamento de hifas e vacuolização de hifas do patógeno (Xue,

2003a;b). *Clonostachys rosea* também degradou escleródios de *Claviceps purpurea* no solo e, *in vitro*, degradou escleródios de *S. sclerotiorum* e inibiu sua germinação (Ondřej et al., 2010). Acredita-se que a eficiência de parasitismo de diferentes isolados de *C. rosea* seja variável, pois isolados obtidos de raízes mortas foram menos eficientes do que isolados obtidos de escleródios de *C. purpurea* (Ondřej et al., 2010; Zizzerini & Tosi, 1985). Os isolados usados no presente experimento provieram de folhas (Nobre et al., 2005). Como a população de microrganismos do solo difere daquela do filoplano (Huang & Erickson, 2008), sugere-se obter isolados de *C. rosea* de outros locais, principalmente de rizoplano, rizosfera e solo, para aumentar a chance de seleção de isolados mais competitivos.

Em diferentes níveis de temperatura, *C. rosea* reduziu a germinação de escleródios apenas no solo autoclavado, e a temperatura não afetou a germinação. No solo autoclavado, a temperatura também não afetou a recuperação de *C. rosea*. Assim, conclui-se que *C. rosea*, mesmo em temperaturas abaixo do ótimo de crescimento, tem potencial em reduzir a viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum*. Acima de 30°C, houve redução significativa da viabilidade dos escleródios, em solo autoclavado (Wu et al., 2008; Matheron & Porchas, 2005; Hao et al., 2003; Adams, 1987). Entre 5 e 25°C, *C. minitans* reduziu a viabilidade dos escleródios, em solos autoclavados e natural (Huang & Erickson, 2008). Para os autores, a eficiência de *Trichoderma virens* ocorreu no solo natural apenas a 25°C, enquanto a de *Epicoccum purpurascens*, *Talaromyces flavus* e *Trichothecium roseum* ocorreu apenas no solo autoclavado a 5, 15 e 20°C. Em folhas de framboesa, *C. rosea* é antagonista efetivo a *Botrytis cinerea* entre 20 e 30°C (Yu & Sutton, 1998). O ótimo para crescimento micelial e a colonização de folhas de morango por *C. rosea* foi 25°C (Cota et al., 2008a). O ótimo para o crescimento micelial de *C. minitans* e infecção de escleródios de *S. sclerotiorum* foi entre 15 e 25°C, com o máximo a 30°C (Yang et al., 2010; Huang & Erickson, 2008; Mcquilken et al., 1997). *Clonostachys rosea* pode colonizar o solo em ampla faixa de temperatura. No experimento sobre o efeito da temperatura, encontrou-se *C. rosea* nos solos pasteurizado (nas duas execuções) e natural (na segunda execução) apenas a 14°C. Como se acredita que *C. rosea* competiu com outros microrganismos no solo, infere-se também que 14°C foi desfavorável a esses microrganismos. Entretanto, a 14°C, não se avaliou a população total de microrganismos, nem a germinação dos escleródios reduziu-se, nos solos pasteurizado e natural. A 14°C, os escleródios não tinham qualquer deformação, enquanto a 26 e

30°C, desintegraram-se após seis semanas, quando a umidade estava na capacidade de campo (31,3% w.w⁻¹). Entretanto, mesmo fragmentados, os escleródios estavam viáveis. Sabe-se que a desintegração pode se iniciar, em três semanas com umidade constante, ou em quatro semanas com reposição da umidade a cada 7 dias (Matheron & Porchas, 2005). A 26°C, ocorreu desintegração total dos escleródios após 42 dias em três tipos de solos inundados (Moore, 1949). Assim, demanda-se estudar mais o efeito da temperatura na interação *C. rosea* – *S. sclerotiorum*

A umidade não afetou a inibição da germinação dos escleródios por *C. rosea* nas três condições do solo. A viabilidade dos escleródios foi similar nos solos autoclavado sem *C. rosea*, pasteurizado e natural. A umidade também não afetou a sobrevivência de *C. rosea* no solo autoclavado. O antagonista cresceu e reduziu a viabilidade de escleródios em tanto próximo ao ponto de murcha permanente (18,6% w.w⁻¹) como na capacidade de campo (31,3% w.w⁻¹). Porém, já se detectou interação da umidade e temperatura na viabilidade. Entre 4 a 28°C, independentemente da umidade, a viabilidade de *C. minitans* foi alta; acima de 28°C, a viabilidade dependeu da umidade do solo (Yang et al., 2010). A umidade também não afetou a eficiência de *C. minitans*, *T. virens*, *Epicoccum purpurascens*, *Talaromyces flavus* e *Trichothecium roseum* em inibir a germinação de escleródios de *S. sclerotiorum* em solo autoclavado; no solo natural, apenas *C. minitans* foi eficiente, e colonizou escleródios em vários níveis de umidade e temperatura (Huang & Erickson, 2008). Como lembrado para a temperatura, demanda-se entender melhor o efeito da umidade do solo na interação *C. rosea* – *S. sclerotiorum*.

No solo autoclavado, a concentração de conídios do antagonista não afetou a germinação de escleródios de *S. sclerotiorum* nem a sobrevivência de *C. rosea*. Assim, *C. rosea*, mesmo em baixas concentrações, reduziu a viabilidade de escleródios. Quando aplicado em 5×10^3 ufc em sementes, o antagonista foi eficiente em promover o crescimento de cevada e controlar *Fusarium culmorum* (Jensen et al., 2000). Em folhas de morangueiro, com 10^4 conídios.ml⁻¹, controlou-se *Botrytis cinerea* (Yu & Sutton, 1998). Em solo autoclavado, quando se adicionou *C. minitans*, a 10^3 ufc g⁻¹ solo, após 30 dias a população do antagonista foi superior a 10^6 ufc g⁻¹ solo, em solo com alta umidade (Bennett et al., 2003). Para os autores, com a adição de 10^6 ufc g⁻¹ solo, as concentrações inicial e final não diferiram após 30 dias. Provavelmente, com a incorporação de nutrientes à suspensão de conídios, a população inicial de *C. rosea* poderia aumentar. Não se encontraram relatos

relacionados à aplicação de *C. rosea* no solo, em diferentes concentrações. Assim, recomenda-se efetuar novos estudos para viabilizar a aplicação do antagonista no solo, inclusive com a associação de fontes exógenas de nutrientes.

No solo autoclavado, *C. rosea* suprimiu a germinação dos escleródios dormentes e dos condicionados para germinação miceliogênica. Nesse solo, sem o antagonista, e nos solos pasteurizado e natural, a germinação dos escleródios nos dois estádios foram similar. Recuperou-se *C. rosea* apenas no solo autoclavado. Assim, *C. rosea*, quando presente e estabelecido no solo, inibiu a germinação dos escleródios, independentemente do estádio em que se encontram. Já se demonstrou que escleródios condicionados para germinação miceliogênica são mais vulneráveis ao ataque de antagonistas que os dormentes (Huang & Erickson, 2008). O resultado aqui obtido é interessante, pois *C. rosea* foi altamente eficiente em inibir a germinação dos escleródios dormentes, considerados como mais resistentes.

Não se teve sucesso em obter germinação carpogênica dos escleródios de *S. sclerotiorum*. Alguns fatores, como umidade, aeração, temperatura e intensidade luminosa influenciam a germinação carpogênica. A 25 e 30°C, Abawi & Grogan (1975) não obtiveram produção de apotécios, enquanto Sun & Yang (2000) obtiveram produção substancial. O efeito da temperatura na germinação carpogênica varia com o isolado, principalmente com sua origem geográfica (Huang & Kozub, 1993; Huang & Kozub, 1991). Possivelmente, as condições de temperatura nesse experimento afetaram a produção de apotécios, sendo necessários mais estudos relacionando-se a temperatura à produção *in vitro* desses ascocarpos. Em Viçosa, apotécios não se formam em campo de produção (Trazilbo José de Paula Júnior, informação pessoal), mas se formaram em areia úmida em casa de vegetação (Luiz Antônio Maffia, informação pessoal). A produção de apotécio demanda altos níveis de umidade (Sun & Yang, 2000). No presente experimento, usou-se a umidade na capacidade de campo, ideal para germinação carpogênica (Wu & Subbarao, 2008; Kora et al., 2005; Huang & Kozub, 1991). Outros autores obtiveram germinação carpogênica em ampla faixa de umidade (Sun & Yang, 2000). Escleródios demandam aeração para germinar carpogenicamente (Wu et al., 2008; Teo & Morrall, 1985). O uso de Parafilm para selar as placas de Petri contendo solo com escleródios pode ter afetado a germinação carpogênica. Apesar de se manter o solo úmido, possivelmente o fornecimento de oxigênio foi limitado (Wu & Subbarao, 2008). Dois fatores adicionais podem também ter restringido a germinação: *i.* com a umidade alta, no solo peneirado havia muitos

microporos preenchidos com água; e *ii.* os experimentos transcorreram em incubadoras tipo B.O.D, com ventilação interna e pouca troca gasosa com o ambiente. O tamanho do escleródio afeta a produção de apotécios: escleródios pequenos não produzem apotécio, o que é fator limitante em experimentos (Hao et al., 2003; Dillard et al., 1995). No presente trabalho, classificaram-se os escleródios produzidos (de 1,68 a 3,36 mm) como pequenos, e que pode ter influenciado na produção de apotécio. Para germinar carpogenicamente, os escleródios também precisam de luz suficiente; caso contrário, germinarão miceliogenicamente (Tu, 1989). A luminosidade pode ter sido deficitária, pois a iluminação na incubadora não foi uniforme, e a luz não se distribuiu por todas as placas com o solo. O tipo de solo ou substrato pode afetar a germinação carpogênica: solos não cultivados têm características supressivas evidenciadas por retardamento no aparecimento de estipes e formação mais lenta dos apotécios (em torno de 60 dias de incubação), em relação ao solo cultivado (em torno de 45 dias) ou substrato (Costa & Costa, 2006). Nesse experimento, usou-se solo não cultivado e, até os 50 dias, não se observou a produção de estipes. Em experimentos futuros, deve-se priorizar o uso de solos cultivados. Na germinação carpogênica, além do envolvimento dos fatores ambientais, há efeito significativo em vista da variabilidade de *S. sclerotiorum*. Lehner et al. (2011) relatou a variabilidade morfológica de isolados de Minas Gerais, inclusive quanto à germinação. Os isolados usados nos experimentos provieram do campo experimental Prof. Diogo Alves de Melo, da UFV, onde não se observa formação de apotécios na área plantada com soja e feijão. Portanto, demanda-se executar testes preliminares, para definir os melhores níveis dos fatores ambientais e selecionar isolados para obter a germinação desejada.

Com base nos resultados, verifica-se que *C. rosea* é antagonista potencial a *S. sclerotiorum*, pois no solo autoclavado, parasitou os escleródios eficientemente, independentemente dos efeitos de temperatura, umidade, concentração de conídios e estádios do escleródio (dormente e condicionado para germinação miceliogênica). Entretanto, o antagonista não foi eficiente em solo natural. Há necessidade de se avaliar a incorporação de substrato com fontes de energia para o antagonista, além de estudos que busquem determinar os principais fatores que interferem na eficiência de parasitismo de escleródios dormentes. Finalmente, para auxiliar a avaliar o potencial do biocontrole, demandam-se mais estudos sobre a epidemiologia do mofo branco, principalmente no Brasil.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que:

Clonostachys rosea tem potencial em reduzir a viabilidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. O antagonismo foi marcante em solo autoclavado, mas inexistiu em solos naturais e pasteurizado;

A temperatura, umidade, estágio do escleródio e a concentração de conídios do antagonista não interferiram na viabilidade dos escleródios de *S. sclerotiorum*;

A sobrevivência de *C. rosea* no solo não foi afetada pela temperatura, umidade e a concentração de conídios do antagonista.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abawi, G.S.; Grogan, R.G. Source of primary inoculum and effects of temperature and moisture on infection of beans by *Whetzelinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 65:300-309, 1975.
- Adams, P.B. Effects of soil temperature, moisture, and depth on survival and activity of *Sclerotinia minor*, *Sclerotium cepivorum*, and *Sporidesmium sclerotivorum*. *Plant Disease* 71:170-174, 1987.
- Adams, P.B.; Ayers, W.A. Ecology of *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69:896-899, 1979.
- Bae, Y.S.; Knudsen, G.R. Effect of sclerotial distribution pattern of *Sclerotinia sclerotiorum* on biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. *Applied Soil Ecology* 35:21-24, 2007.
- Baker, K.F.; Cook, R.J. Biological control of pathogens. San Francisco: W.H. Freeman and Company, 433p., 1974.
- Bardin, S.D.; Huang, H.C. Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23:88-98, 2001.
- Bennett, A.J.; Leifert, C.; Whipps, J.M. Effect of combined treatment of pasteurisation and *Coniothyrium minitans* on sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. *European Journal of Plant Pathology* 113:197-209, 2005.
- Bennett, A.J.; Leifert, C.; Whipps, J.M. Survival of *Coniothyrium minitans* associated with sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 38:164-172, 2006.
- Bennett, A.J.; Leifert, C.; Whipps, J.M. Survival of the biocontrol agents *Coniothyrium minitans* and *Bacillus subtilis* MBI 600 introduced into pasteurised, sterilised and non-sterile soils. *Soil Biology and Biochemistry* 35:1565-1573, 2003.
- Bennett, A.J.; Whipps, J.M. Beneficial microorganism survival on seed, roots and in rhizosphere soil following application to seed during drum priming. *Biological Control* 44:349-361, 2008.
- Bettiol, W.; Morandi, M.A.B.; Pinto, Z. V.; Paula Júnior, T.J.; Correa, E. B.; Moura, A. B.; Lucon, C. M. M.; Costa, J. C.; Bezerra, J. L. Bioprotetores Comerciais para Doenças de Plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 17:27-47, 2009.
- Boland, G.J.; Hall, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 16:93-108, 1994.

- Bolton, M.D.; Thomma, B.P.H.J.; Nelson, B.D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology* 7:1-16, 2006.
- Budge, S.P.; McQuilken, M.P.; Fenlon, J.S.; Whipps, J.M. Use of *Coniothyrium minitans* and *Gliocladium virens* for biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* in glasshouse lettuce. *Biological Control* 5:513-522, 1995.
- Charchar, M.J.D.A.; Nasser, L.C.B.; Barreto, L.A.J.C.; Vivaldi, L.J. Efeito de diferentes práticas culturais no controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) do feijoeiro irrigado. *Fitopatologia Brasileira* 16 (Supl):20, 1991.
- Chaves, G.M. Estudos sobre *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary. *Experientiae* 4:69-133, 1964.
- Chitarra, L.G. Identificação e controle das principais doenças do algodoeiro. Campina Grande: Embrapa Algodão, 84p., 2008.
- Clarkson, J.P.; Phelps, K.; Whipps, J.M.; Young, C.S.; Smith, J.A.; Watling, M. Forecasting sclerotinia disease on lettuce: A predictive model for carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia. *Phytopathology* 97:621-631, 2007.
- Clarkson, J.P.; Phelps, K.; Whipps, J.M.; Young, C.S.; Smith, J.A.; Watling, M. Forecasting *Sclerotinia* disease on lettuce: Toward developing a prediction model for carpogenic germination of sclerotia. *Phytopathology* 94:268-279, 2004.
- Cook, G.E.; Steadman, J.R.; Boosalis, M.G. Survival of *Whetzelinia sclerotiorum* and initial infection of dry edible beans in Western Nebraska. *Phytopathology* 65:250-255, 1975.
- Costa, G.R.; Costa, J.L.d.S. Influência do solo e de substratos para produção de escleródios na germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pesquisa Agropecuaria Tropical* 36:83-87, 2006.
- 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* 46:312-317, 2008a.
- 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* 46:515-522, 2008b.
- Del Rio, L.E.; Martinson, C.A.; Yang, X.B. Biological control of *Sclerotinia* stem rot of soybean with *Sporidesmium sclerotivorum*. *Plant Disease* 86:999-1004, 2002.

- Dillard, H.R.; Ludwig, J.W.; Hunter, J.E. Conditioning sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* for carpogenic germination. *Plant Disease* 79:411-415, 1995.
- Dow, R.L.; Porter, D.M.; Powell, N.L. Effect of environmental factors on *Sclerotinia minor* and *Sclerotinia* blight of peanut. *Phytopathology* 78:672-676, 1988.
- Elad, Y. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Protection* 19:709-714, 2000.
- Ferguson, L.M.; Shew, B.B. Wheat straw mulch and its impacts on three soilborne pathogens of peanut in microplots. *Plant Disease* 85:661-667, 2001.
- Ferraz, L.C.L.; Cafe, A.C.; Nasser, L.C.B.; Azevedo, J. Effects of soil moisture, organic matter and grass mulching on the carpogenic germination of sclerotia and infection of bean by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology* 48:77-82, 1999.
- Ferreira, L.P.; Lehman, P.S.; Almeida, A.M.R. Moléstias e seu controle. In: Miyasaka, S.; Medina, J.C., (eds.). *A soja no Brasil*. Campinas: IAC, pp. 603-639, 1981.
- Finlayson, J.E.; Rimmer, S.R.; Pritchard, M.K. Infection of carrots by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal Plant Pathology* 11:242-246, 1989.
- Fravel, D.R. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 43:337-359, 2005.
- Garcia, R.A. Produção de inóculo, efeito de extratos vegetais e de fungicidas e reação de genótipos de soja à *Sclerotinia sclerotiorum*. 154 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2008.
- Gerlagh, M.; Goossen-van de Geijn, H.M.; Hoogland, A.E.; Vereijken, P.F.G. Quantitative aspects of infection of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia by *Coniothyrium minitans* – timing of application, concentration and quality of conidial suspension of the mycoparasite. *European Journal of Plant Pathology* 109:489-502, 2003.
- Görgen, C.A.; Neto, A.M.N.S.; Carneiro, L.C.; Ragagnin, V.; Junior, M.L. Controle do mofo-branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 44:1583-1590, 2009.
- Handelsman, J.; Stabb, E.V. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The Plant Cell* 8:1855-1869, 1996.
- Hao, J.J.; Subbarao, K.V.; Duniway, J.M. Germination of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum* sclerotia under various soil moisture and temperature combinations. *Phytopathology* 93:443-450, 2003.
- Harman, G.E.; Howell, C.R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorito, M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews. Microbiology* 2:43-56, 2004.

- Holley, R.C.; Nelson, B. Effect of plant population and inoculum density on incidence of *Sclerotinia* wilt of sunflower. *Phytopathology* 76:71-74, 1986.
- Homechin, M. Controle biológico de patógenos do solo. In: Bettioli, W., ed. Controle biológico de doença de plantas. Jaguariúna: Embrapa-CNPDA, pp. 7-23, 1991.
- Homechin, M. Plantas daninhas hospedeiras de *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fitopatologia Brasileira* 7 (Supl.):472, 1982.
- Howell, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87:4-10, 2003.
- Huang, H.C.; Chang, C.; Kozub, G.C. Effect of temperature during sclerotial formation, sclerotial dryness, and relative humidity on myceliogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Botany* 76:494-499, 1998.
- Huang, H.C.; Erickson, R.S. Factors affecting biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* by fungal antagonists. *Journal of Phytopathology* 156:628-634, 2008.
- Huang, H.C.; Erickson, R.S. Survey of diseases of dry bean in southern Alberta in 1999. *Canadian Plant Disease Survey* 80:73-74, 2000.
- Huang, H.C.; Erickson, R.S.; Chang, C.; Moyer, J.R.; Larney, F.J.; Huang, J.W. Control of white mold of bean caused by *Sclerotinia sclerotiorum* using organic soil amendments and biocontrol agents. *Plant Pathology Bulletin* 14:183-190, 2005.
- Huang, H.C.; Kozub, G.C. Influence of inoculum production temperature on carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Microbiology* 39:548-550, 1993.
- Huang, H.C.; Kozub, G.C. A simple method for production of apothecia from sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Protection Bulletin* 31:333-345, 1989.
- Huang, H.C.; Kozub, G.C. Temperature requirements for carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates of different geographic origin. *Botanical Bulletin Academia Sinica* 32:279-286, 1991.
- 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* 106:233-242, 2000.
- Jones, E.E.; Mead, A.; Whipps, J.M. Evaluation of different *Coniothyrium minitans* inoculum sources and application rates on apothecial production and infection of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia. *Soil Biology and Biochemistry* 35:409-419, 2003.

- Jones, E.E.; Whipps, J.M. Effect of inoculum rates and sources of *Coniothyrium minitans* on control of *Sclerotinia sclerotiorum* disease in glasshouse lettuce. *European Journal of Plant Pathology* 108:527-538, 2002.
- Kora, C.; McDonald, M.; Boland, G. Epidemiology of sclerotinia rot of carrot caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 27:245, 2005.
- Le Tourneau, D. Morphology, cytology, and physiology of *Sclerotinia* species in culture. *Phytopathology* 69:887-890, 1979.
- Lehner, M.S.; Paula Júnior, T.J.; Teixeira, H.; Vieira, R.F.; Bonicontró, B.F.; Carneiro, J.E.S.; Mizubuti, E.S.G. Morphological variability of *Sclerotinia sclerotiorum* sampled from bean fields in Minas Gerais State, Brazil. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative* 54:128-129, 2011.
- Leite, R.M.V.B.C. Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. Londrina: Embrapa Soja, 3p., 2005.
- Li, G.Q.; Huang, H.C.; Acharya, S.N. Antagonism and biocontrol potential of *Ulocladium atrum* on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological Control* 28:11-18, 2003.
- 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* 43:211-218, 2002.
- Li, Y.B.; Yongli, Z.; Nian, L.B. Study on the dissemination distance of sunflower stem rot fungus. *Plant Protection* 20:12-13, 1994.
- Louzada, G.A.d.S.; Carvalho, D.D.C.; Mello, S.C.M.; Júnior, M.L.; Martins, I.; Braúna, L.M. Potencial antagonístico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. *Biota Neotropica* 9:145-149, 2009.
- Mamarabadi, M.; Jensen, D.F.; Lübeck, M. An N-acetyl-beta-D-glucosaminidase gene, cr-nag1, from the biocontrol agent *Clonostachys rosea* is up-regulated in antagonistic interactions with *Fusarium culmorum*. *Mycological Research* 113:33-43, 2009.
- Marques, E.J.; Villas Boas, A.M.; Pereira, C.E.F. Orientações técnicas para a produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorock. em laboratorios setoriais. Piracicaba: Planalsucar, 23p., 1981.
- Matheron, M.E.; Porchas, M. Influence of soil temperature and moisture on eruptive germination and viability of sclerotia of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum*. *Plant Disease* 89:50-54, 2005.
- Mclean, K.L.; Madsen, M.; Stewart, A. The effect of *Coniothyrium minitans* on sclerotial viability of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Ciborinia camelliae*. *New Zealand Plant Protection* 57:67-71, 2004.

- McQuilken, M.P.; Budge, S.P.; Whipps, J.M. Effects of culture media and environmental factors on conidial germination, pycnidial production and hyphal extension of *Coniothyrium minitans*. *Mycological Research* 101:11-17, 1997.
- Melo, I.S.; Faul, J.L.; Nascimento, R.S. Antagonis of *Aspergillus terreus* to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Brazilian Journal of Microbiology* 37:417-419, 2006.
- Moore, W.D. Flooding as a means of destroying the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 39:920-927, 1949.
- 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* 26:311-317, 2003.
- Morandi, M.A.B.; Maffia, L.A.; Sutton, J.C. Development of *Clonostachys rosea* and interactions with *Botrytis cinerea* in rose leaves and residues. *Phytoparasitica* 29:103-113, 2001.
- Morrall, R.A.A. A preliminary study of the influence of water potential on sclerotium germination in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Botany* 55:8-11, 1977.
- 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* 34:132-143, 2005.
- Ondřej, M.; Cagaš, B.; Ondráčková, E. Effect of the mycoflora of ergot (*Claviceps purpurea*) sclerotia on their viability. *Plant Protection Science* 46:66-71, 2010.
- Park, Y.H.; Stack, J.P.; Kenerley, C.M. Selective isolation and enumeration of *Gliocladium virens* and *G. roseum* from soil. *Plant Disease* 76:230-235, 1992.
- Paulitz, T.C.; Bélanger, R.R. Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology* 39:103-133, 2001.
- Peres, A.P.; Nasser, L.C.B.; Machado, J.D.C. Use of semi-selective media for detection of *Sclerotinia sclerotiorum* on bean and soybean seeds. *Fitopatologia Brasileira* 27:123-127, 2002.
- Purdy, L.H. *Sclerotinia sclerotiorum* : History, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. *Phytopathology* 69:875-880, 1979.
- Rabeendran, N.; Jones, E.E.; Moot, D.J.; Stewart, A. Biocontrol of *Sclerotinia* lettuce drop by *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma hamatum*. *Biological Control* 39:352-362, 2006.

- Rabeendran, N.; Jones, E.E.; Moot, D.J.; Stewart, A. Evaluation of selected fungal isolates for the control of *Sclerotinia sclerotiorum* using cabbage pot bioassays. *New Zealand Plant Protection* 58:251-255, 2005.
- Reeleder, R.D. The use of yeasts for biological control of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biocontrol* 49:583-594, 2004.
- Sandys-Winsch, C.; Whipps, J.M.; Gerlagh, M.; Kruse, M. World distribution of the sclerotial mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *Mycological Research* 97:1175-1178, 1993.
- Santos, A.F.; Dhingra, O.D. Pathogenicity of *Gliocladium* on the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fitopatologia Brasileira* 14:198-200, 1989.
- Santos, J.R.M.; Charchar, M.J.; Nasser, L.C.B. Levantamento de patógenos que afetam ervilha irrigada no Distrito Federal. *Fitopatologia Brasileira* 15:98-99, 1990.
- Schroers, H.J. A monograph of *Bionectria* (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and its *Clonostachys* anamorphs. *Studies in Mycology* 46:1-214, 2001.
- Schroers, H.J.; Samuels, G.J.; Seifert, K.A.; Gams, W. Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C.rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. *Mycologia* 91:365-385, 1999.
- Shoresh, M.; Harman, G.E.; Mastouri, F. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology* 48:21-43, 2010.
- Steadman, J.R. Control of plant-diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69:904-907, 1979.
- Steadman, J.R. White Mold - A serious yield-limiting disease of bean. *Plant Disease* 67:346-350, 1983.
- Stewart, A.; Harrison, Y.A. Mycoparasitism of sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. *Australasian Plant Pathology* 18:10-14, 2007.
- Sun, P.; Yang, X.B. Light, temperature, and moisture effects on apothecium production of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease* 84:1287-1293, 2000.
- Sutton, J.C.; Li, D.W.; Peng, G.; Yu, H.; Zhang, P.; Valdebenito-Sanhueza, R.M. *Gliocladium roseum*: A versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Disease* 81:316-328, 1997.
- Teo, B.K.; Morrall, R.A.A. Influence of matric potentials on carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. II. A comparison of results obtained with different techniques. *Canadian Journal of Plant Pathology* 7:365-369, 1985.

- Toledo, A.V.; Virla, E.; Humber, R.A.; Paradell, S.L.; Lastra, C.C. First record of *Clonostachys rosea* (Ascomycota: Hypocreales) as an entomopathogenic fungus of *Oncometopia tucumana* and *Sonesimia grossa* (Hemiptera: Cicadellidae) in Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology* 92:7-10, 2006.
- Tu, J.C. Management of white mold of white beans in Ontario. *Plant Disease* 73:281-285, 1989.
- Van Toor, R.F.; Jaspers, M.V.; Stewart, A. Effect of soil microorganisms on viability of sclerotia of *Ciborinia camelliae*, the causal agent of camellia flower blight. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 33:149-160, 2005.
- Wegulo, S.N.; Sun, P.; Martinson, C.A.; Yang, X.B. Spread of *Sclerotinia* stem rot of soybean from area and point sources of apothecial inoculum. *Canadian Journal of Plant Science* 80:389-402, 2000.
- Whipps, J.; Bennett, A.; Challen, M.; Clarkson, J.; Coventry, E.; Muthumeenakshi, S.; Noble, R.; Rogers, C.; Sreenivasaprasad, S.; Jones, E. Control of sclerotial pathogens with the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. In: Vurro, M.; Gressel, J., (eds.). *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*. Dordrecht: Springer, pp. 223-241, 2007.
- Whipps, J.M. Behaviour of fungi antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum* on plant tissue segments. *Microbiology* 133:1495-1501, 1987.
- Whipps, J.M.; Lumsden, R.D. Commercial use of fungi as plant disease biocontrol agents: Status and prospects. In: Butt, T.; Jackson, C.; Magan, N., (eds.). *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. Wallingford: CABI Publishing, pp. 9-22, 2001.
- Willettts, H.J.; Wong, J.A.L. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, and *Sclerotinia minor* with emphasis on specific nomenclature. *Botanical Review* 46:101-165, 1980.
- Wu, B.M.; Subbarao, K.V. Effects of soil temperature, moisture, and burial depths on carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor*. *Phytopathology* 98:1144-1152, 2008.
- Wu, B.M.; Subbarao, K.V.; Liu, Y.B. Comparative survival of sclerotia of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum*. *Phytopathology* 98:659-665, 2008.
- Xue, A.G. Biological control of pathogens causing root rot complex in field pea using *Clonostachys rosea* strain ACM941. *Phytopathology* 93:329-335, 2003a.
- Xue, A.G. Efficacy of *Clonostachys rosea* strain ACM941 and fungicide seed treatments for controlling the root rot complex of field pea. *Canadian Journal of Plant Science* 83:519-524, 2003b.

- Yang, L.; Li, G.Q.; Long, Y.Q.; Hong, G.P.; Jiang, D.H.; Huang, H.C. Effects of soil temperature and moisture on survival of *Coniothyrium minutans* conidia in central China. *Biological Control* 55:27-33, 2010.
- Young, C.S.; Clarkson, J.P.; Smith, J.A.; Watling, M.; Phelps, K.; Whipps, J.M. Environmental conditions influencing *Sclerotinia sclerotiorum* infection and disease development in lettuce. *Plant Pathology* 53:387-397, 2004.
- 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* 20:243-252, 1998.
- Zizzerini, A.; Tosi, L. Antagonistic activity of fungi isolated from sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology* 34:415-421, 1985.

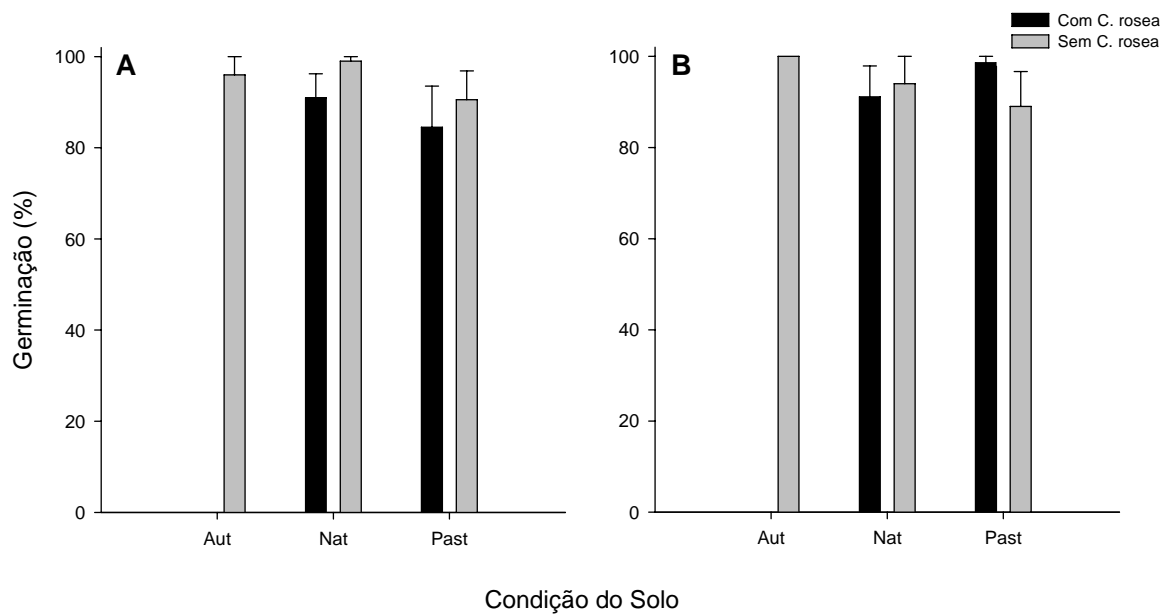


Figura 1 - Germinação miceliogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*, após permanecerem por seis semanas em solo autoclavado (Aut), pasteurizado (Past) ou natural (Nat), na presença ou ausência de *Clonostachys rosea*. A – Escleródios dormentes; B – Escleródios condicionados para germinação miceliogênica. Média de seis repetições; as barras verticais correspondem ao erro padrão da média.

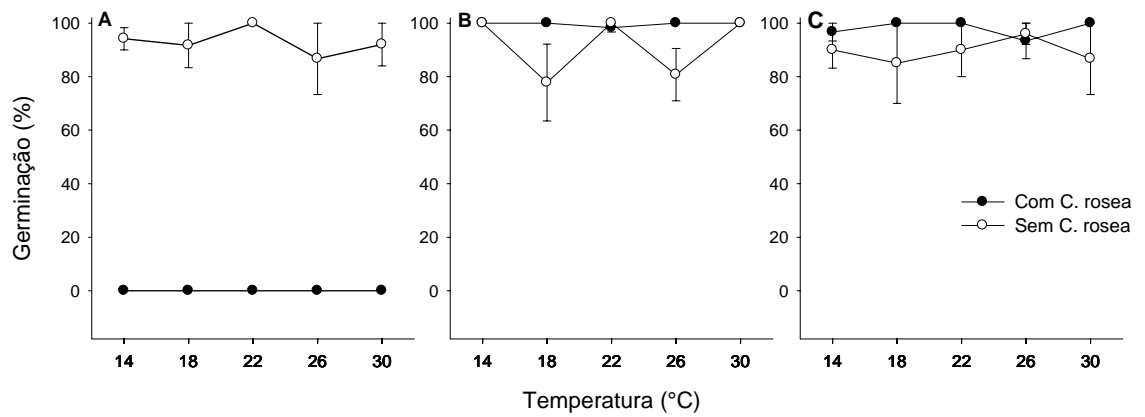


Figura 2 - Germinação miceliogênica de escleródios dormentes de *Sclerotinia sclerotiorum*, após permanecerem por seis semanas em diferentes níveis de temperatura, na presença ou ausência de *Clonostachys rosea*. A - Solo Autoclavado; B – Solo Pasteurizado; C – Solo Natural. Médias de seis repetições; as barras verticais representam o erro padrão da média.

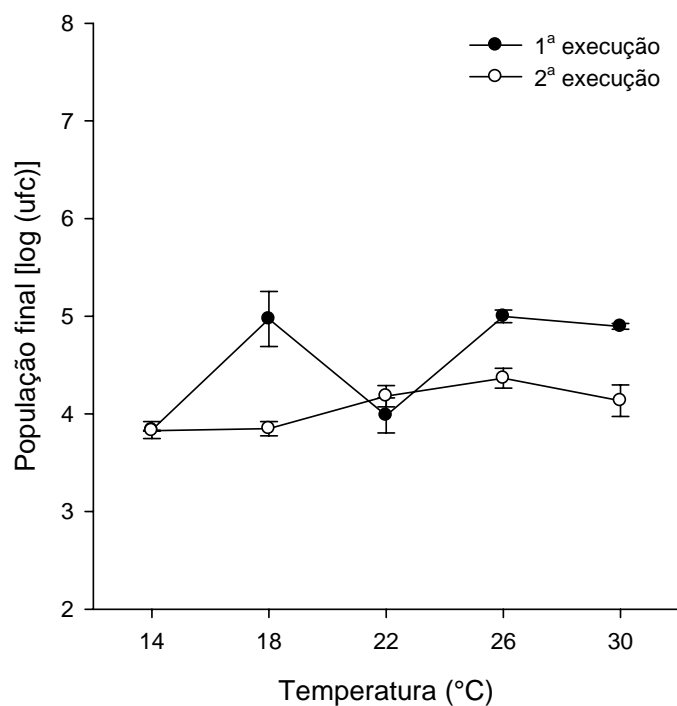


Figura 3 – População final de *Clonostachys rosea*, em unidades formadoras de colônias/g de solo (ufc), em duas execuções do experimento, após incubação por seis semanas em solo autoclavado, em diferentes níveis de temperatura. Os valores de ufc foram transformados para log(ufc). Médias de três repetições, em cada execução. As barras verticais representam o erro padrão da média.

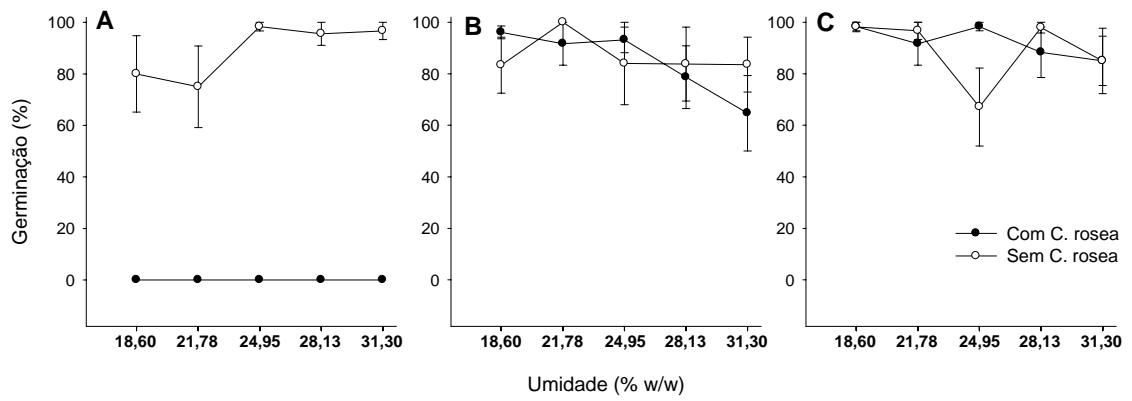


Figura 4 - Germinação miceliogênica de escleródios dormentes de *Sclerotinia sclerotiorum* após permanecerem por seis semanas em diferentes níveis de umidade, na presença ou ausência de *Clonostachys rosea*. A - Solo Autoclavado; B – Solo Pasteurizado; C – Solo Natural. Médias de seis repetições; as barras verticais correspondem o erro padrão da média.

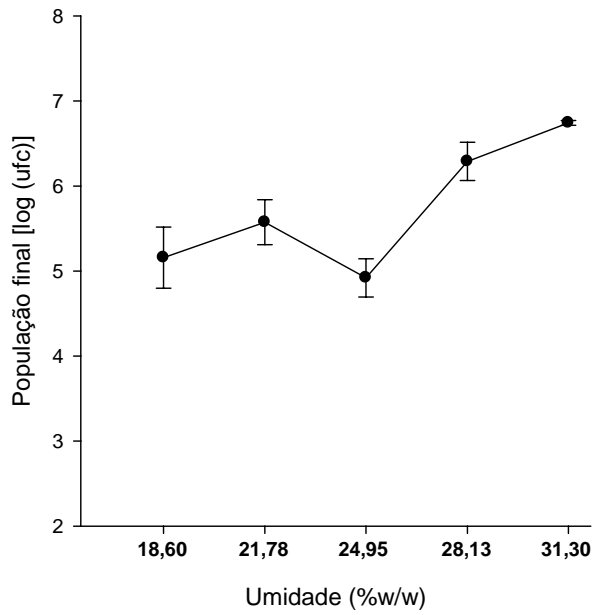


Figura 5 – População final de *Clonostachys rosea*, em unidades formadoras de colônias/g de solo (ufc), após incubação por seis semanas em solo autoclavado, em diferentes níveis de umidade. Os valores de ufc foram transformados para log(ufc). Médias de seis repetições; as barras verticais representam o erro padrão da média.

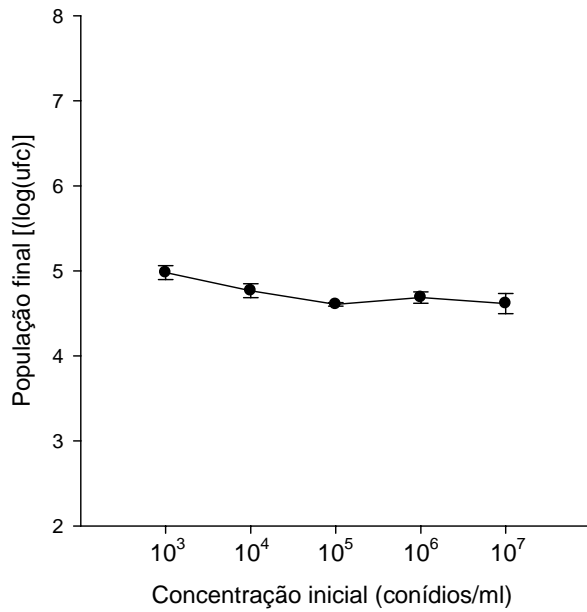


Figura 6 – População final de *Clonostachys rosea*, em unidades formadoras de colônias/g de solo (ufc) após incubação por seis semanas em solo autoclavado, em diferentes níveis de concentração. Os valores de ufc foram transformados para log(ufc). Médias de seis repetições; as barras verticais representam o erro padrão da média.