

RODRIGO MOREIRA SARAIVA

INTERAÇÕES *Clonostachys rosea* – *Botrytis cinerea* – *Solanum lycopersicum*

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2013

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

T

S243i  
2013

Saraiva, Rodrigo Moreira, 1981-  
Interações *Clonostachys rosea* - *Botrytis cinera* -  
*Solanum lycopersicum* / Rodrigo Moreira Saraiva. – Viçosa,  
MG, 2013.  
vii, 131f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

Orientador: Luiz Antonio Maffia  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. *Clonostachys rosea*. 2. Mofo cinzento. 3. Tomate -  
Doenças e pragas - Controle biológico. I. Universidade Federal  
de Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Programa de  
Pós-Graduação em Fitopatologia. II. Título.

CDD 22. ed. 632.4

RODRIGO MOREIRA SARAIVA

INTERAÇÕES *Clonostachys rosea* – *Botrytis cinerea* – *Solanum lycopersicum*

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

Aprovada: 26 de fevereiro de 2013.

---

André G. C. Souza

---

Robert Weingart Barreto

---

Maurício Dutra Costa

---

Fabício de Ávila Rodrigues  
(Coorientador)

---

Luiz Antonio Maffia  
(Orientador)

À minha mãe, Terezinha,  
ao meu filho, Cauã, e à Juliana Cabral,  
com todo carinho, **dedico** este trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha pequena, grande família, em especial à minha mãe. Tudo isso é fruto do seu esforço, Terezinha.

À Juliana Cabral, por ser a melhor companheira do MUNDO.

Ao professor, orientador e mestre Luiz Antonio Maffia, pelos ensinamentos e conselhos.

Aos estagiários Aléfe Borges e Frederico Miranda, pelo suporte durante a realização dos experimentos.

À Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão das bolsas de Doutorado e Sanduíche.

Ao Doutorando Leonardo Araújo e demais integrantes do laboratório do professor Fabrício de Ávila Rodrigues por terem dedicado parte de seus tempos me auxiliando nos trabalhos de microscopia.

Aos professores Eduardo Alves e Kirk Czymmek pela oportunidade do Doutorado Sanduíche.

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

Aos membros da banca, pelas sugestões e críticas.

Aos demais professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos.

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

**Muito obrigado!**

## SUMÁRIO

Resumo .....	vi
Abstract .....	vii
Introdução geral.....	1
Revisão de Literatura.....	6
Fatores importantes para inocular <i>Botrytis cinerea</i> em hastes de tomateiro.....	25
Resumo.....	25
Introdução.....	26
Material e métodos.....	28
Resultados.....	30
Discussão.....	31
Referências.....	34
Tabelas.....	38
<i>Clonostachys rosea</i> no biocontrole do mofo cinzento em tomateiro.....	40
Resumo.....	40
Introdução.....	41
Material e métodos.....	42
Resultados.....	47
Discussão.....	48
Referências.....	53
Tabelas e figuras.....	56
Composto(s) produzidos por <i>Clonostachys rosea</i> com efeito fungistático sobre <i>Botrytis cinerea</i> .....	58
Resumo.....	58
Introdução.....	59

Material e métodos-----	60
Resultados-----	66
Discussão-----	67
Referências-----	71
Tabelas e figuras-----	74
<i>Clonostachys rosea</i> promove o crescimento e biocontrola o mofo cinzento em tomateiros-----	77
Resumo-----	77
Introdução-----	78
Material e métodos-----	80
Resultados-----	85
Discussão-----	89
Referências-----	96
Tabelas-----	101
Interação <i>Clonostachys rosea</i> -tomate na presença e ausência de <i>Botrytis cinerea</i> ----	107
Resumo-----	107
Introdução-----	108
Material e métodos-----	110
Resultados-----	113
Discussão-----	114
Referências-----	121
Tabelas e figuras-----	125
Conclusões-----	131

## RESUMO

SARAIVA, Rodrigo Moreira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2013. **Interações *Clonostachys rosea* – *Botrytis cinerea* – *Solanum lycopersicum*.** Orientador: Luiz Antonio Maffia. Coorientador: Fabrício de Ávila Rodrigues e John Clifford Sutton.

No Brasil, vem crescendo a produção de tomateiro em ambiente protegido, onde ocorrem condições favoráveis ao mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea*. Uma das medidas de manejo da doença é o controle biológico, com *Clonostachys rosea*. Em trabalhos anteriores, selecionaram-se quatro isolados de *C. rosea* eficientes em suprimir *B. cinerea*. Desconhece-se a eficiência da aplicação destes isolados para o tomateiro. No presente trabalho, buscou-se: i) padronizar a metodologia de inoculação de *B. cinerea* em hastes para realizar os trabalhos de controle biológico; ii) avaliar a eficiência dos quatro isolados de *C. rosea* no biocontrole do mofo cinzento; iii) avaliar a produção de composto(s) como mecanismo de antagonismo de *C. rosea* a *B. cinerea*; iv) avaliar a aplicação de *C. rosea* no local e distante do local de inoculação de *B. cinerea* e seu uso como promotor de crescimento; e v) estudar as interações de *C. rosea* com o tomateiro e com *B. cinerea*. Observou-se que tomateiros próximos ao florescimento e partes mais jovens da planta são mais suscetíveis ao mofo cinzento. A severidade da doença reduziu-se com o uso de câmara úmida e não foi afetada com adição de gelatina à suspensão de inóculo. Os quatro isolados de *C. rosea* foram eficientes no controle biológico do mofo cinzento. Estes isolados atuaram por competição por espaço e/ou nutrientes, hiperparasitismo e produção de composto(s) deletério(s) a *B. cinerea*. *Clonostachys rosea* também promoveu o crescimento do tomateiro e foi endofítico, ocupando os espaços intercelulares. O antagonista tem potencial de uso em tomateiros sob cultivo protegido no Brasil, principalmente no contexto do manejo integrado.

## ABSTRACT

SARAIVA, Rodrigo Moreira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2013. **Interactions *Clonostachys rosea* – *Botrytis cinerea* – *Solanum lycopersicum*.** Adviser: Luiz Antonio Maffia. Co-adviser: Fabrício de Ávila Rodrigues and John Clifford Sutton.

Greenhouse tomato production is growing in Brazil. This production condition is favorable for grey mold, caused by *Botrytis cinerea*. Biocontrol by *C. rosea* is used for the disease management. In previous papers, four efficient in suppressing *B. cinerea* *C. rosea* strains were selected. It is unknown if these strains can control the disease in tomato. Therefore, this present paper aimed: i) to standardize a *B. cinerea* stem inoculation methodology for use in future biocontrol experiments; ii) to evaluate the efficiency of the four *C. rosea* strains to grey mold biocontrol; iii) to evaluate the compound production by *C. rosea* as an antagonistic mechanism against *B. cinerea*; iv) to evaluate *C. rosea* application in the same place and far from *B. cinerea* inoculation and *C. rosea* use as a growth promoter; and v) to study *C. rosea* – *B. cinerea* – tomato interactions. It was observed that flowering tomatoes and young tomato sections are more susceptible to grey mold. Moreover, the disease severity was reduced when a humid chamber was used and it was not affected when gelatin was added to the inoculum suspension. The four *C. rosea* strains were efficient on the biocontrol of grey mold and they acted against *B. cinerea* by space and/or nutrient competition, hyperparasitism and deleterious compound(s) production. *Clonostachys rosea* also promoted tomato growth and was endofitic in the plant, living in the intercellular space. Thus, the antagonist has a potential to be used on greenhouse tomato production in Brazil, mainly in the integrated management context.

## INTRODUÇÃO GERAL

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é a segunda hortaliça mais produzida no Brasil (Filgueira, 2008). O cultivo em ambiente protegido, comum em outros países, é alternativa interessante na produção de tomate nos períodos de entressafra e locais de difícil cultivo a céu aberto. Entretanto, nesse tipo de cultivo ocorrem condições ambientais favoráveis a patógenos, como *Botrytis cinerea* Pers.; Fr, agente causal do mofo cinzento ou cancro da haste do tomateiro (Dik & Wubben, 2004). As infecções em tomateiro podem resultar em desfolha severa, morte de flores (Shtienberg et al., 1998), redução do valor comercial de frutos, lesões nas hastes e consequente morte de plantas (Dik et al., 1999). As lesões em hastes podem se originar de infecções em ferimentos causados pela desfolha e desbrota das plantas e/ou por colonização fúngica a partir do pecíolo (O'Neill et al., 1997; Shtienberg et al., 1998; Dik et al., 1999). A doença pode causar perdas severas em casa de vegetação, resultar em morte precoce de mais de 70% dos tomateiros (Shtienberg & Elad, 1997) e, conseqüentemente, reduzir a produtividade (O'Neill et al., 1997).

O controle do mofo cinzento é difícil e dispendioso (Dik et al., 1999), e se baseia, principalmente, na aplicação de fungicidas. Há vários relatos de ocorrência de populações resistentes a fungicidas (Korolev *et al.*, 2009; Myresiotis *et al.*, 2008), e o controle biológico surge como alternativa ao químico. *Clonostachys rosea* (Link: Fr.) Schroers, Samuels, Seifert & W. Gams, fungo antagonista, é eficiente no controle do mofo cinzento em diversas culturas em campo e ambiente protegido (Cota et al., 2008, Morandi et al., 2006; Nobre et al., 2005; Sutton et al., 2002). Na busca por isolados de *C. rosea* adaptados às condições brasileiras, na Unidade de Controle Biológico (UCB) da UFV, selecionaram-se quatro isolados que suprimiram *B. cinerea* em folhas de

tomateiro (Nobre et al., 2005). Esses isolados também foram eficientes no campo, reduzindo a incidência da doença em morangueiros, tanto quanto a aplicação dos fungicidas procimidone e captan (Cota et al., 2008).

*Clonostachys rosea* é conhecido por atuar, principalmente, por micoparasitismo e/ou competição por espaço e nutrientes com o patógeno. O antagonista também produz enzimas e compostos do metabolismo secundário deletérios a outros fitopatógenos (Mamarabadi, et al., 2009; Li et al., 2006; Rodríguez et al., 2011). Identificou-se um gene, *cr-nag1*, no isolado IK726 de *C. rosea* responsável pela produção da enzima N-acetyl- $\beta$ -d-glucosaminidase, que hidrolisa quitina. Ocorreu inibição do crescimento micelial de *Fusarium culmorum* e alta expressão do gene durante a interação com *C. rosea* (Mamarabadi, et al., 2009). Purificou-se uma protease extracelular de *C. rosea* que degradou a cutícula do nematóide *Panagrellus redivivus* (Li et al., 2006). Além de enzimas, compostos do metabolismo secundário produzidos por *C. rosea* também possuem atividade antagônica. O isolado BAF3874 de *C. rosea* produziu um composto, denominado peptídeo antibiótico, com efeito deletério sobre *Sclerotinia sclerotiorum* (Rodríguez et al., 2011).

Além de controlar diversos patógenos (Sutton et al., 1997; Morandi et al., 2003; Baloyi et al., 2011; Chatterton et al., 2012), *C. rosea* pode induzir resistência (Lahoz et al., 2004; Roberti et al., 2008) e promover o crescimento de plantas (Sutton et al., 2008; Bennett et al., 2009), inclusive de tomateiros (Ravnskov et al., 2006). Observou-se que os isolados selecionados na UCB têm potencial em promover o crescimento de diversas culturas (Macedo, 2011) e induzir resistência do pepineiro a *B. cinerea* (Silva, 2012).

Apesar de se saber que *C. rosea* biocontrola doenças e beneficia plantas, há poucos estudos histológicos que relacionam *B. cinerea*, *C. rosea* e a planta hospedeira. Acredita-se que tal conhecimento ajudará a compreender e melhorar características do antagonismo, o que será útil para aprimorar o controle biológico do mofo cinzento. Assim, neste estudo, buscou-se: i) padronizar metodologia de inoculação de *B. cinerea* em hastes para realizar trabalhos de controle biológico; ii) avaliar a eficiência dos quatro isolados de *C. rosea* no biocontrole do mofo cinzento; iii) avaliar a produção de composto(s) como mecanismo de antagonismo de *C. rosea* a *B. cinerea*; iv) avaliar a aplicação de *C. rosea* no local e distante do local de inoculação de *B. cinerea* e seu uso como promotor de crescimento; e v) estudar as interações de *C. rosea* com o tomateiro e com *B. cinerea*.

## Referências

Baloyi MA, Laing MD, Yobo KS (2011) Isolation and in vitro screening of *Bacillus thuringiensis* and *Clonostachys rosea* as biological control agents against sheep nematodes. African Journal of Agricultural Research 6: 5047-5054.

Bennett AJ, Mead A, Whipps JM (2009) Performance of carrot and onion seed primed with beneficial microorganisms in glasshouse and field trials. Biological Control 51: 417-426.

Chatterton S, Punja ZK (2012) Colonization of geranium foliage by *Clonostachys rosea* f. *catenulata*, a biological control agent of botrytis grey mould. Botany-Botanique 90: 1-10.

Cota LV, Maffia LA, Mizubuti ESG, Macedo PEF, Antunes RF (2008) Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. Biological Control 46: 515-522.

Dik AJ, Koning G, Kohl J (1999) Evaluation of microbial antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* stem infection in cucumber and tomato. European Journal of Plant Pathology 105: 115-122.

Filgueira FAR (2008) Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3<sup>th</sup> Ed. Viçosa. UFV.

Korolev N, Mamiev M, Zahavi T, Elad Y (2009) Resistance to fungicides among *Botrytis cinerea* isolates from tomato and other hosts in Israel. 2<sup>nd</sup> International Symposium on Tomato Diseases 808: 367-375.

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

Li J, Yang JK, Huang XW, Zhang KQ (2006) Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor. Process Biochemistry 41: 925-929.

Macedo PEF (2011) Promoção de crescimento de plantas mediada por *Clonostachys rosea*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, Brasil.

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

Morandi MAM, Maffia LA, Mizubuti ESG, Alfenas AC, Barbosa JG, Cruz CD (2006) Relationships of microclimatic variables to colonization of rose debris by *Botrytis cinerea* and the biocontrol agent *Clonostachys rosea*. Biocontrol Science and Technology 16: 619-630.

Morandi MAB, Maffia LA, Mizubuti ESG, Alfenas AC, Barbosa JG (2003) Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: a valuable component in Botrytis blight management in commercial greenhouses. Biological Control 26: 311-317.

Myresiotis CK, Bardas GA, Karaoglanidis GS (2008) Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* to pyraclostrobin and boscalid and control of anilinopyrimidine- and benzimidazole-resistant strains by these fungicides. Plant Disease 92: 1427-1431.

Nobre SAM, Maffia LA, Mizubuti ESG, Cota LV, Dias APS (2005) Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. Biological Control 34: 132-143.

O'Neill TM, Shtienberg D, Elad, Y (1997) Effect of some host and microclimate factors on infection of tomato stems by *Botrytis cinerea*. Plant Disease 81: 36-40.

Ravnskov S, Jensen B, Knudsen IMB, Bodker L, Jensen DF, Karlínski L, Larsen J (2006) Soil inoculation with the biocontrol agent *Clonostachys rosea* and the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* results in mutual inhibition, plant growth promotion and alteration of soil microbial communities. Soil Biology & Biochemistry 38: 3453-3462.

Roberti R, Veronesi A, Cesari A, Cascone A, Di Berardino I, Bertini L, Caruso C (2008) Induction of PR proteins and resistance by the biocontrol agent *Clonostachys rosea* in wheat plants infected with *Fusarium culmorum*. *Plant Science* 175: 339-347.

Rodriguez MA, Cabrera G, Gozzo FC, Eberlin MN, Godeas A (2011) *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. *Journal of Applied Microbiology* 110: 1177-1186.

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

Shtienberg D, Elad Y, Ariela Niv, Nitzani Y, Kirshner B (1998) Significance of leaf infection by *Botrytis cinerea* in stem rotting of tomatoes grown in non-heated greenhouses. *European Journal of Plant Pathology* 104: 753-763.

Silva, PRA (2012) Interação *Clonostachys rosea*, Silício e *Botrytis cinerea* em pepineiro. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, Brasil.

Sutton JC, Li DW, Peng G, Yu H, Zhang P, Valdebenito-Sanhueza RM (1997) *Gliocladium roseum*: A versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Disease* 81: 316-328.

Sutton JC, Liu W, Huang R, Owen-Going N (2002) Ability of *Clonostachys rosea* to establish and suppress sporulation potential of *Botrytis cinerea* in deleafed stems of hydroponic greenhouse tomatoes. *Biocontrol Science and Technology* 12: 413-425.

Sutton JC, Liu W, Ma J, Brown WG, Stewart JF, Walker GD (2008) Evaluation of the fungal endophyte *Clonostachys rosea* as an inoculant to enhance growth, fitness and productivity of crop plants. *Acta Horticulturae* 782: 279-286.

## REVISÃO DE LITERATURA

### *Clonostachys rosea*: uso e perspectiva de um promissor agente de biocontrole

#### 1. Controle Biológico

O controle de doenças de plantas, por muitas décadas, objetivou eliminar patógenos através do uso contínuo de produtos químicos. Isso resultou no uso indiscriminado de pesticidas que, por sua vez, ocasionaram problemas como seleção de isolados resistentes, ocorrência de surtos de doenças consideradas secundárias e redução de micro-organismos benéficos, além de causar efeitos deletérios ao homem, animais e ao meio ambiente, com o acúmulo de resíduos no solo, água e nos alimentos. Sabe-se que o uso excessivo de agrotóxicos não é a melhor opção para uma agricultura sustentável. Assim, a busca por métodos alternativos de controle de doenças vem aumentando. 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), é um dos métodos mais pesquisados.

O uso do controle biológico de doenças de plantas é ainda recente, com aproximadamente 60 anos (Baker & Cook, 1974), e a quantidade de produtos comerciais disponíveis no mercado ainda é pequena, representando menos que 1% dos produtos usados na agricultura. Embora o número de produtos e a porcentagem de comercialização sejam baixos, a importância de agentes de biocontrole vem aumentando, e espera-se um aumento anual de, aproximadamente, 10% na taxa de comercialização de produtos de origem biológica, que incluem agentes de biocontrole, semioquímicos e feromônios (Bailey et al., 2010). Com maior número destes produtos disponíveis no mercado, espera-se menor dependência de fungicidas, reduzindo os resíduos químicos nos alimentos e no ambiente bem como o risco de contaminação dos aplicadores. Em alguns casos, o

uso de um agente de biocontrole é o melhor método de manejo de doenças (Shtinberg & Elad, 1997; Elad & Stewart, 2004; Fravel 2005).

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 de outros métodos de controle, estabelecendo-se o que se chama de manejo integrado. Em vista de lacunas no conhecimento como, por exemplo, o entendimento da ecologia do patógeno e do antagonista, nem sempre há pleno sucesso do controle biológico. Além disso, muitos micro-organismos quando cultivados em grande escala e sucessivamente, podem perder ou reduzir sua atividade de antagonismo, diminuindo a eficiência e a credibilidade do controle (Grigoletti et al, 2000). Desta forma, estudar os efeitos climáticos que influenciam o antagonista, a interação antagonista x patógeno x planta e a produção em larga escala é crucial para o sucesso do método. Existem vários casos de sucesso com uso de agentes de biocontrole na agricultura. Montesinos (2003) cita diferentes agentes microbianos registrados em diferentes países.

Na busca por antagonistas que sejam eficientes, grande ênfase vem sendo dada ao fungo *Clonostachys rosea* Bainier. Esta revisão aborda as principais características e a versatilidade desse fungo e seu uso no controle biológico.

## **2. *Clonostachys rosea*: taxonomia, Ecologia e Usos**

*Clonostachys rosea* (Link Fries) [forma perfeita = *Bionectria ochroleuca*], anteriormente classificado como *Gliocadium roseum* (Schroers et al., 1999), é um hifomiceto que produz conídios unicelulares em conidióforos de dois tipos, penicilado e verticilado. As colônias do fungo em meio de cultura são geralmente esbranquiçadas, alaranjadas ou salmão, o que dá o nome à espécie. A fase sexuada, *B. ochroleuca*, é incluída na classe Ascomycetes, ordem Hypocreales.

O antagonista está presente naturalmente no solo, restos culturais e plantas daninhas, podendo ser encontrado em regiões temperadas, tropicais e desérticas (Nobre et al., 2005; Sutton et al., 1997). Já foi relatado em culturas, campo, matas, florestas, água-doce e solos litorâneos, particularmente em locais com pH variando entre neutro e alcalino (Sutton et al., 1997). O fungo é conhecido por colonizar raízes, hastes, vagens, folhas e sementes de diversas espécies de plantas. Por exemplo, obteve-se o antagonista a partir de hastes, vagens, folhas e sementes de soja (Schiller & Sinclair, 1984), raízes de trevo vermelho, folhas de morango e framboesa (Sutton et al., 1997), bem como colonizando cistos de *Heterodera* spp., *Globodera* spp. e outras espécies de nematóides (Jones et al., 1986; Kennerley et al., 1987) e escleródios de fungos de diversas espécies (Stewart & Harrison, 1989; Keinath et al., 1991; Sutton & Peng, 1993). O fungo é eficiente em colonizar solos e plantas em ampla faixa de temperatura, variando de 18 – 30°C. Entretanto, para morango, maior eficiência ocorreu a 24°C (Cota et al., 2008b). *Bionectria ochroleuca*, a fase sexuada, é encontrada principalmente em ramos mortos de árvores, em plantas herbáceas e tecidos carnosos de plantas e fungos (Sutton et al., 1997).

Para realização e aumento da eficiência do controle biológico, é de grande importância compreender as características e os mecanismos de ação dos agentes envolvidos no processo (Elad & Stewart, 2004; Fravel, 2005). Segundo Sutton (1995), fazer parte da microbiota, não se desenvolver a temperatura de 37°C e apresentar baixa toxicidade, por exemplo, são características deste antagonista que têm estimulado seu uso como agente de biocontrole. Outra vantagem é sua capacidade de se estabelecer endofiticamente em tecidos verdes de algumas espécies de plantas (Sutton et al., 1997; Yu & Sutton, 1997; Köhl & Fokkema, 1998; Morandi et al., 2001). O agente de controle ideal seria aquele com diferentes modos de antagonismo. *Clonostachys rosea* apresenta

diferentes mecanismos, como competição por nutrientes e substratos, micoparasitismo, produção de enzimas eficientes no controle de patógenos, entomopatogenicidade e indução de resistência.

Os estudos para uso do antagonista concentram-se no que diz respeito ao controle de fungos fitopatogênicos, principalmente por competição por nutrientes e espaço ou por micoparasitismo. Como exemplo, tem-se o controle de *Aphanomyces euteiches*, *Alternaria alternata*, *Alternaria dauci*, *Alternaria radicans*, *Botrytis cinerea*, *Erysiphe orontii*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lisi*, *Fusarium solani* f. sp. *lisi*, *Moniliophthora roreri*, *Moniliophthora perniciosa*, *Mycosphaerella pinodes*, *Phytophthora palmivora*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* (Sutton et al., 1993; Sutton et al., 1997; Tatagiba et al., 1998; Jensen et al., 2000; Krauss & Soberanis, 2001; Morandi et al., 2001; Lubeck et al., 2002; Sutton et al., 2002; ; Jensen et al., 2002; Morandi et al., 2003; Xue, 2003; Lahoz et al., 2004; Nobre et al., 2005; Morandi et al., 2006; Cota et al., 2008 ab; Morandi et al., 2008; Roberti et al., 2008; Mamarabadi et al., 2009; Correa et al., 2010; Rodriguez et al., 2011).

Hifas de *C. rosea* podem parasitar conídios, escleródios e hifas de *B. cinerea* (Sutton et al., 1997). Ao microscópio eletrônico de varredura, observou-se que hifas do antagonista estrangulavam hifas de *B. cinerea* (Morandi et al., 2001), após penetração direta. O antagonista promovia a ruptura e degradação das células do patógeno (Li et al., 2002). Também se constatou o micoparasitismo em *Moniliophthora roreri*, *Moniliophthora perniciosa* e *Phytophthora palmivora* (Krauss & Soberanis, 2001). Em estudo “in vitro”, observou-se que *C. rosea* parasitou *Alternaria alternata*, *Aphanomyces euteiches*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lisi*, *F. solani* f. sp. *lisi*, *Mycosphaerella pinodes*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, e *Sclerotinia sclerotiorum*, fungos responsáveis por provocar o complexo de podridão radicular da ervilha, doença de difícil controle e o principal fator limitante na produção da cultura no Canadá (Xue, 2003). Os autores observaram,

em condições controladas, que a aplicação do antagonista nas sementes de ervilha aumentou a germinação e emergência em 44 e 22%, respectivamente. Reduziu-se a severidade da doença em 76%, redução superior à com aplicação de thiram, de 65%. Quando se aplicaram os tratamentos no campo, ambos foram eficientes no controle e não diferiram entre si (Xue, 2003).

Sob condição controlada, o isolado BAFC3874 de *C. rosea* foi eficiente no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de alface ou soja (Rodriguez et al., 2011). Os autores concluíram que *C. rosea* atuava principalmente por antibiose, produzindo compostos antifúngicos associados ao metabolismo secundário, e por micoparasitismo (Rodriguez et al., 2011).

Além do micoparasitismo, outro importante modo de ação de *C. rosea* é competição por espaço e nutrientes. Alguns autores consideram a competição como o principal mecanismo de antagonismo de *C. rosea* (Sutton & Peng, 1993; Morandi et al., 2001, 2003). Em experimento para avaliar a eficiência de *C. rosea* no controle do complexo de podridão radicular da ervilha, o antagonista colonizou as sementes e se estabeleceu nas raízes, provavelmente impedindo a infecção pelos patógenos (Xue, 2003). *Clonostachys rosea* compete com *B. cinerea* e inibe sua esporulação. O antagonista foi eficiente em competir e reduzir a esporulação de *B. cinerea* em begônia, tomate, gerânio, framboesa e morango (Sutton et al., 1997). Em tecidos de framboesa inoculados com o antagonista, a germinação dos conídios e a formação do apressório de *B. cinerea* não ocorreu. O antagonista compete por nutrientes e nicho com *B. cinerea*, o que inibe a germinação e estabelecimento do patógeno. (Sutton et al., 1997). O isolado canadense PG-88-710 reduziu em mais de 99% a esporulação de *B. cinerea* em folhas de roseira mesmo quando aplicado 24 h após a inoculação do patógeno (Morandi et al., 2001). Para os autores, este fato comprova a grande habilidade competitiva de *C. rosea*, pois pode estabelecer e reduzir a esporulação do patógeno mesmo quando este já está presente (Morandi et al., 2001). O isolado PG-88-710 também competiu

com *B. cinerea* em morangueiro, eucalipto e roseira reduzindo a esporulação do patógeno em estudos realizados no Brasil (Valdebenito-Sanhuenza et al., 1997; Von Stowasser & Ferreira, 1997; Morandi et al., 2001; Morandi et al., 2003).

O sucesso obtido no controle biológico de *B. cinerea* por *C. rosea* estimulou a busca por isolados, e se obtiveram quatro isolados do antagonista em condições brasileiras (NCR19/F, NCR60/F, NCR61/F, NCR62/F). Estes isolados foram eficientes em competir e reduzir a esporulação de *B. cinerea* em folhas de morangueiro, roseira, eucalipto e tomateiro (Nobre et al., 2005). Todos os quatro isolados colonizaram folhas de morangueiro em curtos ou longos períodos de molhamento foliar, o que garantiu vantagem competitiva sobre *B. cinerea* (Cota et al., 2008b). Porém, em temperaturas inferiores a 10°C, *C. rosea* é pouco eficiente em colonizar e competir com *B. cinerea* (Cota et al., 2008b). Em experimentos de campo, realizados em Viçosa-MG, os quatro isolados controlaram eficientemente *B. cinerea* em folhas, flores e frutos de morangueiro. A aplicação semanal da mistura dos quatro isolados foi tão eficiente quanto à pulverização de fungicidas em duas aplicações semanais, e resultou em maior nível de controle e incrementos superiores a 100% da produção (Cota et al., 2008a). Nesse experimento, observou-se que a temperatura, média em torno de 16°C, não limitou a atuação do antagonista. Por outro lado, temperaturas baixas reduziram a habilidade competitiva de *C. rosea* (Kohl et al., 1999). Alta incidência de luz solar associada à baixa umidade relativa reduziu a germinação de *C. rosea*, porém mesmo quando aplicado em condições adversas em casa de vegetação (alta radiação solar, baixa umidade) o antagonista estabeleceu-se e controlou *B. cinerea* (Morandi et al., 2008).

O sucesso do biocontrole de *B. cinerea* por *C. rosea* em vários hospedeiros ocorre em vista de o antagonista se estabelecer nos tecidos de plantas e competir com o patógeno na ausência de molhamento foliar, em períodos prolongados de molhamento foliar, independente do estágio de

desenvolvimento dos tecidos e possuir requerimentos de temperaturas próximos aos do patógeno (Morandi et al., 2000; Morandi et al., 2003; Morandi et al., 2006; Morandi et al., 2008; Cota et al., 2008b).

Avaliou-se a integração do biocontrole, usando *C. rosea*, com remoção dos restos culturais e controle químico no manejo do mofo cinzento do morangueiro em condições de campo, e a aplicação do agente de controle biológico foi o elemento chave no manejo (Cota et al., 2009). Para os autores, por se estabelecer e explorar mais rápido o substrato que o patógeno, a competição foi o principal mecanismo que levou à supressão do patógeno (Cota et al., 2009).

O antagonista também é eficiente no controle biológico de nematóides, principalmente de espécies de *Meloidogyne*. O fungo pode parasitar ovos e pode produzir dois tipos de enzimas, protease e quitinase, que são chaves para o antagonismo (Khan et al., 2006). Além disso, o fungo pode penetrar diretamente na cutícula do nematóide após a formação do apressório. Já se observou cistos de *Heterodera* spp, e *Globodera* spp. parasitados por *C. rosea* (Sutton et al., 1997) e outros nematóides tanto de plantas como de animais (Zhang et al., 2008; Khan et al., 2006; Zou et al., 2010 ab; Baloyi et al., 2011). Por meio de microscopia de fluorescência, um isolado transformado de *C. rosea*, expressando a green fluorescent protein (GFP), foi antagonista ao nematóide *Panagrellus redivivus* (Zhang et al., 2008). Segundo os autores, os conídios do antagonista aderiram-se à cutícula do nematoide e, após iniciar a germinação, os tubos germinativos penetraram no nematóide, levando-o à imobilização e, posteriormente, à morte. Adicionalmente, no corpo do nematóide houve produção intensa de micélio e esporos, o que pode gerar novos ciclos, inclusive em outros nematóides.

*Clonostachys rosea* também é considerado um fungo entomopatogênico. O antagonista parasitou a broca do cafeeiro quando aplicado em insetos adultos. Estes morreram, havendo

formação imediata de micélio e de esporos do antagonista (Vega et al., 2008). Os autores determinaram que da inoculação até nova esporulação do antagonista, transcorreram-se aproximadamente 16 dias. Na Argentina, encontrou-se *C. rosea* parasitando *Oncometopia tucumana* (Hemiptera) e *Sonesimia grossa* (Cicadellidae), vetores importantes de *Xylella fastidiosa*, agente causal da Clorose variegada dos citros (Toledo et al., 2006). Os autores isolaram o fungo, após o isolamento, aplicaram-no em insetos de diferentes idades e, após 14 dias, detectaram-se mortalidade de 82,5% e 45,5% em *O. tucumana* e *S. grossa*, respectivamente.

*Clonostachys rosea* também produz compostos antifúngicos e enzimas que degradam a parede de fungos, mas o papel dessas substâncias no parasitismo ainda não foi completamente elucidado (Sutton et al., 1997). O antagonista produz, principalmente, proteases e quitinases, enzimas importantes no processo de infecção de nematóides e de insetos (Li et al., 2006; Mamarabadi, et al., 2009; Lianming et al., 2011). É provável que o antagonista produza outros compostos, que podem degradar paredes de oomicetos, como *Pythium ultimum* (Mamarabadi, et al., 2009).

Compostos do metabolismo secundário produzidos por *C. rosea* são também usados no parasitismo de fungos. Em pareamento de culturas do isolado BAFC3874 do antagonista e *Sclerotinia sclerotiorum*, observou-se que *C. rosea* atua principalmente produzindo compostos antifúngicos associados ao metabolismo secundário (Rodriguez et al., 2011).

Outra característica importante de *C. rosea* é sua capacidade de promover crescimento de diferentes espécies de plantas. A aplicação do isolado canadense Pg 88-710 de *C. rosea* aumentou o crescimento e a produção de roseiras, gerânios, pepinos (Sutton et al., 2008) e tomateiros (Sabine et al., 2006). Os autores analisaram os nutrientes em folhas e detectaram aumento do conteúdo de fósforo e redução de nitrogênio após a aplicação do antagonista. A aplicação do antagonista

também aumentou a matéria de tomateiros, avaliadas 30 dias após o semeio (Macedo, 2011). Aparentemente, a interação antagonista x espécies de plantas ou isolados do antagonista x espécies de plantas é específica, e há relatos de insucesso. Por exemplo, o antagonista reduziu a incidência da podridão das raízes, causada por *Pythium aphanidermatum*, mas não promoveu o crescimento de plantas de alface cultivadas hidroponicamente (Correa et al., 2010).

Recentemente, observou-se que o antagonista também induziu resistência a patógenos em algumas espécies de plantas. Após tratar raízes de plantas de tabaco com *C. rosea*, analisou-se o extrato foliar das plantas quanto aos níveis de  $\beta$ -1,3-glucanases,  $\beta$ -1,4-glicosidases, quitinases, N-acetil-b-glucosaminidase e peroxidases (Lahoz et al., 2004). Para os autores, as atividades de  $\beta$ -1,3-glucanases,  $\beta$ -1,4-glicosidases e chitinases aumentaram nas plantas tratadas com o antagonista. Os autores também concluíram que a severidade do oídio foi menor em plantas tratadas e inoculadas com *Erysiphe orontii* nas folhas, que em plantas não tratadas. Esta foi a primeira constatação de *C. rosea* como indutor de resistência de plantas.

Para verificar se *C. rosea* induziria resistência em trigo a *Fusarium culmorum*, aplicou-se o antagonista nas sementes e inoculou-se o patógeno. Analisaram-se proteínas (PR4), peroxidases e quitinases. Com aplicação de *C. rosea*, as plantas produziram os compostos de defesa mais rapidamente, induzindo resistência em trigo (Roberti et al., 2008). A produção rápida de compostos de defesa é de grande importância, pois em alguns casos as plantas conseguem reconhecer o patógeno e iniciar sua defesa. Porém, em certas ocasiões o ataque é muito rápido e, quando a planta produz os compostos de defesa, a infecção já está adiantada, e o patógeno não é inativado. A aplicação de *C. rosea* promoveu, também, maior e mais vigoroso crescimento das raízes de trigo, provavelmente, porque *C. rosea* reduz a atividade de fungos prejudiciais e favorece a absorção de nutrientes (Roberti et al., 2008).

Uma vantagem competitiva importante de *C. rosea* é sua capacidade de se estabelecer endofiticamente em tecidos verdes (Sutton et al., 1997; Morandi et al., 2000; Morandi et al., 2001), o que permite que o antagonista permaneça por longo tempo nos tecidos e já esteja presente quando da chegada do patógeno. Ademais, permanecendo como endofítico, o agente de biocontrole também fica menos exposto a condições adversas do meio. Quando se sugere que *C. rosea* seja endofítico, as avaliações são indiretas. Após sua aplicação, fragmentos de tecidos vegetais são colocados em meio de cultura e se avalia a colonização dos tecidos. Por exemplo, o antagonista estabeleceu-se em hastes de tomateiro e suprimiu a esporulação de *B. cinerea* por 11 semanas após a sua aplicação (Sutton et al., 2002). Posteriormente, os autores quantificaram a colonização dos tecidos, após desinfestação superficial e deposição em meio PCA e verificaram a presença do antagonista como endofítico. Geralmente, fungos endofíticos proporcionam às plantas hospedeiras maior proteção a patógenos e insetos e melhoram a absorção de nutrientes (Veja et al., 2008; Elmi et al., 2000; Wicklow et al., 2005).

Em síntese, *C. rosea* é um organismo cosmopolita, antagonista por meio de vários mecanismos a diversos fungos patogênicos, nematóides e insetos e que pode promover o crescimento e a indução de resistência em plantas. Em vista destas características, acredita-se que *C. rosea* seja competitivo e adaptável, podendo ser usado em diferentes ambientes. Nos Estados Unidos e no Canadá já existe um produto registrado a base de *C. rosea* chamado Endofine. No Brasil, há um produto à base do antagonista, Clonosnat, que não é registrado.

### **3. Produção Massal**

Há vários aspectos cruciais para viabilizar o biocontrole com micro-organismos. Dentre esses, é importante desenvolver protocolo de produção do inóculo em grande escala, o que envolve

obter uma formulação estável do micro-organismo e de um substrato apropriado à produção, bem como determinar as condições de cultivo e de estocagem (Elad & Stewart, 2004).

Uma das mais importantes é a de produção, incluindo a seleção do meio, o tipo de processo utilizado na 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 massal é obter a maior quantidade de propágulos eficazes no menor período de tempo. Um possível limitante do processo é o custo, em vista do valor de substrato ou do processo de produção em grande escala (Fravel, 2005). Assim, a busca por substratos baratos, eficientes na produção massal e de fácil utilização é crucial no desenvolvimento de produtos à base de agentes de biocontrole.

Pode-se produzir propágulos de um antagonista por meio de fermentação líquida, difásica ou sólida. A fermentação sólida consiste no uso de substratos como grãos de cereais e resíduos agrícolas, com pequenas quantidades de água no substrato e ausência de água livre (Pandey, 2003). A produção de propágulos em estado sólido é vantajosa, em vista do baixo custo, praticidade e fácil execução. Ademais, esporos produzidos por meio de fermentação sólida são mais robustos e com maior longevidade que os produzidos em fermentação líquida (Jensen et al., 2002).

No processo de fermentação, o meio de cultivo deve satisfazer a critérios como a disponibilidade de nutrientes, baixo custo e fácil preparo 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. Há vários substratos orgânicos, como cereais, para a produção massal de antagonistas (Viccini, 2004; Fravel, 2005).

Comumente, produzem os esporos de *C. rosea* com a metodologia descrita por Sutton & Yu (1994): *C. rosea* cresce em grãos de trigo durante 35 dias em média, a 20 - 23°C. Vem-se testando outros substratos e metodologias de produção nos últimos anos. Viccini (2004), usando grãos de trigo e arroz para produção de esporos de *C. rosea*, observou que a produção de esporos, em 40 dias de fermentação, obtida usando arroz como substrato ( $1,05 \times 10^9$  esporos/g substrato) foi uma ordem de magnitude maior que aquela obtida com grãos de trigo ( $1,47 \times 10^8$  esporos/g substrato). Sutton et al. (1997) obtiveram maior produção de esporos, usando grãos de trigo como substrato ( $1$  a  $5 \times 10^9$  esporos.g<sup>-1</sup> obtido em 35 dias de fermentação), enquanto Krauss & Soberanis (2001) usaram arroz como substrato eficaz para produção massal de propágulos de *C.rosea*.

Avaliar substratos alternativos e ao mesmo tempo eficientes para multiplicar *C. rosea* é de grande importância. Morandi (1997) avaliaram grãos de trigo, arroz com casca, arroz integral e folhas de roseira, e observaram esporulação abundante nas folhas de roseiras, após 15 dias ( $3,9 \times 10^8$  conídios/g); 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 de trigo, arroz com casca e arroz integral, respectivamente).

Adotou-se mistura de turfa, farelo de trigo e água (15:26:59) na produção de conídios do isolado IK726 de *C. rosea* (Jensen et al., 2002). No Brasil, na região de Bento Gonçalves, RS, *C. rosea* é produzido em escala semi-comercial pela Embrapa Uva e Vinho (Valdebenito-Sanhueza et al., 1997).

#### **4. Vida de Prateleira (sobrevivência)**

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).

A formulação de antagonistas para uso comercial geralmente envolve a mistura de propágulos viáveis com materiais inertes, como caolim, e fonte de nutrientes, havendo produção de pós molháveis ou grânulos. Os materiais inertes podem ajudar a estabilizar a formulação, 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).

O período de vida de prateleira é crucial para o sucesso comercial de uma formulação à base de micro-organismo. Recomenda-se prazo de validade mínimo de 1 ano, com o mínimo de perdas na viabilidade, de preferência sem refrigeração (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).

Wraight et al. (2001) relatam que umidade e temperatura são fatores importantes no armazenamento do agente de biocontrole. A secagem rápida de conídios pode ser 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 à secagem rápida, após produção massal em 20 dias em mistura de turfa, farelo de trigo e água.

A eficiência no armazenamento de uma formulação também depende da embalagem de armazenamento. Por exemplo, uma formulação com baixa umidade ou armazenada a vácuo, requer embalagens impermeáveis, sendo a de folhas laminadas de polietileno-alumínio as mais adequadas. Em contraposição, para formulações em que o oxigênio é necessário para sobrevivência do antagonista, embalagens de polietileno são eficientes. Estas permitem as trocas gasosas e formam

barreira contra perda e ganho de umidade. Sacolas plásticas, sacos de alumínio, potes de polipropileno são embalagens já utilizadas no armazenamento de *C. rosea*. Pode-se usar dessecantes como sílica gel nas formulações, o que melhora a capacidade de armazenamento em temperatura ambiente (Jensen et al., 2002).

### **Conclusão e perspectivas futuras**

Com a restrição crescente aos pesticidas convencionais, a busca por organismos eficientes no controle de doenças e a demonstração da eficiência por meio de pesquisas bem conduzidas determinarão o aumento de produtos à base de agentes de biocontrole. *Clonostachys rosea* é um destes agentes com comprovada eficiência no controle de vários patógenos. Este fungo é amplamente, atua por diversos mecanismos de antagonismo, pode crescer endofiticamente em espécies vegetais, tem diversas vantagens ecológicas e esporula abundantemente em alguns substratos. Estas características favorecem o uso do antagonista como agente de biocontrole. Demandam-se estudos epidemiológicos, toxicológicos e ambientais para aumentar a disponibilidade de produtos à base de *C. rosea* seguros ao produtor, consumidor e ao ambiente. Além disso, há necessidade de estudos em diversos sistemas, para melhor entender a interação planta x patógeno x antagonista, estudar o comportamento de *C. rosea* na planta hospedeira e no ambiente. Demanda-se, também, o desenvolvimento de formulações estáveis e eficientes. Também, requerem-se estudos em que *C. rosea* seja parte do manejo integrado de doenças. Tais estudos proporcionarão o aumento de credibilidade, gerando condição ideal de uso do produto e contribuindo para o estabelecimento de uma agricultura mais sustentável.

### **Referências**

Bailey KL, Boyetchko SM, Langle T (2010) Social and economic drivers shaping the future of biological control: A Canadian perspective on the factors affecting the development and use of microbial biopesticides. *Biological Control* 52: 221-229.

Baloyi MA, Laing MD, Yobo KS (2011) Use of mixed cultures of biocontrol agents to control sheep nematodes M.A. *Veterinary Parasitology*.

Baker KF, Cook RJ (1974) *Biological control of pathogens*. San Francisco: Freeman and Company. 433p.

Cota LV, Maffia LA, Mizubuti ESG, Macedo PEF (2009) Biological control by *Clonostachys rosea* as a key component in the integrated management of strawberry gray mold. *Biological Control* 50: 222-230.

Cota LV, Maffia LA, Mizubuti ESG (2008a) Brazilian isolates of *Clonostachys rosea*: colonization under different temperature and moisture conditions and temporal dynamics on strawberry leaves. *Letters in Applied Microbiology* 46: 312-317.

Cota LV, Maffia LA, Mizubuti ESG, Macedo PEF, Antunes RF (2008b) Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. *Biological Control* 46: 515-522.

Correa EB, Bettiol W, Morandi MAB (2010) Biological control of *Pythium aphanidermatum* root rot and growth promotion of hydroponic lettuce by *Clonostachys rosea*. *Tropical Plant Pathology* 35: 248-252.

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

Elmi AA, West CP, Robbins RT, Kirkpatrick TL (2000) Endophyte effects on reproduction of a root-knot nematode (*Meloidogyne marylandi*) and osmotic adjustment in tall fescue. *Grass and Forage Science* 55: 166-172.

Fravel DR (2005) Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 43: 337-359.

Grigoletti Jr A, Santos AF, Auer CG (2000) Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. In: *Floresta* 30. Edição especial. 200p.

Jensen B, Knudsen IMB, Jensen DF (2002) Survival of conidia of *Clonostachys rosea* on stored barley seeds and their biocontrol efficacy against seed-borne *Bipolaris sorokiniana*. *Biocontrol Science and Technological* 12: 427-441.

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

Jones GM, Rodriguez-Kabana R, Jatala P (1986) Fungi associated with cysts of potato cyst nematodes in Peru. *Nematropica* 16:21-31.

- Kennerley CM, Jeger MJ, Zuberer DA, Jones RW (1987) Populations of fungi associated with sclerotia of *Phymatotrichum omnivorum* in Houston black clay. Transactions of the British Mycological Society 89:437-445.
- Keinath AP, Fravel DR, Papavizas GC (1991) Potential of *Gliocladium roseum* for biocontrol of *Verticillium dahliae*. Phytopathology 81: 644-648.
- Khan A, Williams KL, Nevalainen HKM (2006) Infection of plant-parasitic nematodes by *Clonostachys rosea* and *Monacrosporium lysipagum*. Biological Control 51, 659-678.
- Köhl J, Lomabers-van der Plas CH, Molhoek WML, Kessel GJT (1999) Competitive ability of the antagonists *Ulocladium atrum* and *Gliocladium roseum* at temperatures favourable for *Botrytis spp.* development. Biocontrol 44:329-46.
- Köhl J, Fokkema NJ (1998) Biological control of *Botrytis cinerea* by suppression of sporulation. In: The 1998 Brighton Conference - Pests & Diseases, Proceedings: 681-686.
- Krauss U, Soberanis W (2001) Biocontrol of cocoa pod diseases with mycoparasite mixtures. Biological Control 22: 149-158.
- Lahoz E, Contillo R, Porrone F (2004) Induction of systemic resistance to *Erysiphe orontii* cast in tobacco by application on roots of an isolate of *Gliocladium roseum* Bainier. Journal of Phytopathology 152: 465-470.
- Li GQ, Huang HC, Kokko EG, Acharya SN (2002) Ultrastructural study of mycoparasitism of *Gliocladium roseum* on *Botrytis cinerea*. Botanical Bulletin of Academia Sinica 43: 211-218.
- Li J, Yang J, Huang X, Zhang KQ (2006) Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor. Process Biochem 41: 925-929.
- Lianming L, Jinkui Y, Juan L, Mo Y, Li L, Zhao X, Zhang KQ (2011) Cloning and homology modeling of a serine protease gene (PrC) from the nematophagous fungus *Clonostachys rosea*. Annals of Microbiology 61: 511-516.
- Lubeck M, Knudsen IMB, Jensen B, Thrane U, Janvier C, Jensen DF (2002) GUS and GFP transformation of the biocontrol strain *Clonostachys rosea* IK726 and the use of these marker genes in ecological studies. Mycological Research 106: 815-826.
- Mamarabadi M, Jensen DF, Lubeck M (2009) An N-acetyl-b-D-glucosaminidase gene, cr-nag1, from the biocontrol agent *Clonostachys rosea* is up-regulated in antagonistic interactions with *Fusarium culmorum*. Mycological Research 113: 33-43.
- Montesinos E (2003) Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. International Microbiology 6: 245-252.

- Morandi MAB, Mattos LPV, Santos ER, Bonugli RC (2008) Influence of application time on the establishment, survival, and ability of *Clonostachys rosea* to suppress *Botrytis cinerea* sporulation on rose debris. *Crop Protection* 27: 77-83.
- Morandi MAB, Maffia LA, Mizubuti ESG, Alfenas AC, Barbosa JG, Cruz CD (2006) Relationships of microclimatic variables to colonization of rose debris by *Botrytis cinerea* and the biocontrol agent *Clonostachys rosea*. *Biocontrol Science and Technology* 16: 619-630.
- Morandi MAB, Maffia LA, Mizubuti ESG, Alfenas AC, Barbosa JG (2003) Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: a valuable component in Botrytis blight management in commercial greenhouses. *Biological Control* 26: 311–317.
- Morandi MAB, Maffia LA, Sutton JC (2001) Development of *Clonostachys rosea* and interactions with *Botrytis cinerea* in rose leaves and residues. *Phytoparasitica* 29: 1-11.
- Morandi MAB, Sutton JC, Maffia LA (2000) Effects of host and microbial factors on development of *Clonostachys rosea* and control of *Botrytis cinerea* in rose. *European Journal of Plant Pathology* 106: 439-448.
- Morandi MAB (1997) *Gliocladium roseum* como agente de biocontrole de *Botrytis cinerea* em roseiras cultivadas em casa de vegetação. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa MG, Brasil.
- Moretini A, Melo IS (2007) Formulation of *Coniothyrium minitans* for biocontrol of white mold caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 42: 155-161.
- Nobre SAM, Maffia LA, Mizubuti ESG, Cota LV, Dias APS (2005) Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. *Biological Control* 34: 132-143.
- Pandey A (2003) Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13: 81-84.
- Roberti R, Veronesi A, Cesari A, Cascone A, Di Berardino I, Bertini L, Caruso C (2008) Induction of PR proteins and resistance by the biocontrol agent *Clonostachys rosea* in wheat plants infected with *Fusarium culmorum*. *Plant Science* 175: 339-347.
- Rodríguez MA, Cabrera G, Gozzo FC, Eberlin MN, Godeas A (2011) *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. *Journal of Applied Microbiology* 110: 1177–1186.
- Sabaratnam S, Traquair JA (2002) Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. *Biological Control* 23: 245–253.
- Sarembaud JA, Feinberg M (2007) Comparison of shelf-life appraisal techniques for the estimation of the limiting date of stability for agrifood reference materials. *Analytica Chimica ACTA* 603: 75-83.

- Schiller CT, Sinclair JB (1984) Microorganisms associated with soybean vascular exudate and plant parts. *International Journal of Tropical Plant Diseases* 2: 1-4.
- Schroers HJ, Samuels GJ, Seifert KA, Gams W (1999) Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. *Mycologia* 91: 365-385.
- Shtienberg D, Elad Y (1997) Incorporation of weather forecasting in integrated, biological-chemical management of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 87: 332-340.
- Stewart A, Harrison YA (1989) Myco- parasitism of sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. *Australas. Plant Pathology* 18: 10-14.
- Stirling GR, Smith LJ, Licastro KA, Eden LM (1998) Control of root-knot nematode with formulations of the nematodetrapping fungus *Arthrobotrys dactyloides*. *Biological Control* 11: 224–230.
- Sutton JC, Liu W, Ma J, Brown WG, Stewart JF, Walker GD (2008) Evaluation of the fungal endophyte *Clonostachys rosea* as an inoculant to enhance growth, fitness and productivity of crop plants. *Acta Horticulturae* 782: 279-286.
- Sutton JC, Liu W, Hwang R, Owen-going N (2002) Ability of *Clonostachys rosea* to establish and suppress sporulation potential of *Botrytis cinerea* in defoliated stems of hydroponic greenhouse tomatoes. *Biocontrol Science and Technology* 12: 413-425.
- Sutton JC, Li DW, Peng G, Yu H, Zhang P, Valdebenito-Sanhuenza RM (1997) *Gliocladium roseum*: A versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Disease* 81: 316-328.
- Sutton JC (1995) Evaluation of micro-organisms for biocontrol: *Botrytis cinerea* and strawberry, a case study. *Advances in Plant Pathology* Vol. 2, New York, Academic Press. pp.173-190.
- Sutton JC, Yu H (1994) Inoculum production of *Gliocladium roseum*. Ontario: Department of Environmental Biology. University of Guelph, 1p.
- Sutton JC, Peng G (1993) Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. *Phytopathology* 83: 615-621.
- Tatagiba J S, Maffia LA, Barreto RW, Alfenas AC, Sutton JC (1998) Biological control of *Botrytis cinerea* in residues and flowers of rose (*Rosa hybrida*). *Phytoparasitica* 26: 8-19.
- Toledo AV, Virla E, Humber RA, Paradell SL, Lastra CCL (2006) First record of *Clonostachys rosea* (Ascomycota : Hypocreales) as an entomopathogenic fungus of *Oncometopia tucumana* and *Sonesimia grossa* (Hemiptera : Cicadellidae) in Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology* 92: 7-10.

- Valdebenito-Sanhuenza RM, Sutton JC, Perazzolo I, Czermainski ABC (1997) Controle Biológico de *Botrytis cinerea* em morangueiros cultivados em estufa. Fitopatologia Brasileira 22: 69-73.
- Vega FE, Posada F, Aime MC, Pava-Ripoll M, Infante F, Rehner SA (2008) Entomopathogenic fungal endophytes. Biological Control 46: 72-82.
- Viccini G (2004) Otimização da produção de esporos do fungo *Clonostachys rosea* – um biopesticida para a cultura do morangueiro. Dissertação de Mestrado. Paraná PR, Brasil.
- Von Stowasser ES, Ferreira FA (1997) Avaliação de fungos para biocontrole de *Botrytis cinerea* em viveiros suspensos de Eucalipto. Revista Árvore 21: 147-153.
- Wraight SP, Jackson MA, Kock SL (2001) Production, Stabilization and Formulation Biocontrol. In: Butt, T.M.; Jackson, C.W. & Magan, N. Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential. Cab International.
- Wicklow DT, Roth S, Deyrup ST, Gloer JB (2005) A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. Mycological Research 109: 610-618.
- Xue AG (2003) Biological control of pathogens causing root rot complex in field pea using *Clonostachys rosea* strain ACM941. Phytopathology 93: 329-335.
- Yu H, Sutton JC (1997) Morphological development and interactions of *Gliocladium roseum* and *Botrytis cinerea* in raspberry. Canadian Journal of Plant Pathology 19: 237-246.
- Zhang L, Yang JK, Niu QJ, Zhao XN, Ye FP, Liang LM, Zhang KQ (2008) Investigation on the infection mechanism of the fungus *Clonostachys rosea* against nematodes using the green fluorescent protein. Applied Microbiology and Biotechnology 78: 983-990.
- Zou CG, Tao N, Liu WJ, Yang JK, Huang XW, Liu XY, Tu HH, Gan ZW and Zhang KQ (2010a) Regulation of subtilisin-like protease *prC* expression by nematode cuticle in the nematophagous fungus *Clonostachys rosea*. Environmental Microbiology 12: 3243-3252.
- Zou CG, Xu YF, Liu WJ, Zhou W, Tao N, Tu HH, Huang XW, Yang JK, Zhang KQ (2010b) Expression of a Serine Protease Gene *prC* Is Up-Regulated by Oxidative Stress in the Fungus *Clonostachys rosea*: Implications for Fungal Survival. Plos One 5.

## CAPÍTULO 1

### Fatores importantes para inocular *Botrytis cinerea* em hastes de tomateiro

#### Resumo

No Brasil, vem crescendo a produção de tomateiro em ambiente protegido, onde ocorrem condições favoráveis ao mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea*. Em trabalhos de controle biológico de *B. cinerea*, ocorreu insucesso em inocular o patógeno em tomateiro. Objetivando-se padronizar metodologia de inoculação em hastes, delinearam-se experimentos para avaliar: i. a agressividade de isolados do patógeno; ii. a idade de tomateiros para inoculação; iii. a suscetibilidade dos tecidos em diferentes alturas da haste; iv. a necessidade de câmara úmida pós-inoculação; e v. a efetividade de gelatina para aderir o inóculo. Obteve-se sucesso na infecção de isolado preservado obtido de tomateiro, após ser inoculado em pecíolos e ser reisolado. Um isolado obtido do morangueiro foi agressivo, porém menos que o de tomateiro. Tomateiros próximo ao florescimento, aos 65 dias do semeio, e as partes mais jovens, meio e topo, são mais suscetíveis. A severidade da doença reduziu-se com o uso de câmara úmida e não foi afetada com adição de gelatina à suspensão de inóculo. Adotou-se essa metodologia em trabalhos com *B. cinerea* em tomateiro, com resultados reproduzíveis. Com os resultados descritos, espera-se contribuir com pesquisadores que venham a trabalhar com o mofo cinzento em tomateiro.

## 1. Introdução

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é a segunda hortaliça mais produzida no Brasil (Filgueira, 2008), sendo cultivado ao longo do ano na maioria dos estados, apesar de as condições ambientais limitarem o cultivo em campo aberto em algumas épocas. O cultivo em ambiente protegido, comum em outros países, é alternativa interessante na produção de tomate nos períodos de entressafra e locais de difícil cultivo a céu aberto.

As hortaliças passaram a ser amplamente cultivadas em ambiente protegido no Brasil a partir do fim dos anos 1980 e início dos 1990 (Goto & Tivelli, 1998). Seguindo essa tendência, o cultivo protegido do tomateiro vem crescendo, principalmente nas regiões Sul e Sudeste (Martins, 1992), onde se concentra a produção de hortaliças. A importância do cultivo protegido varia com a região e época de cultivo, e objetiva proteger a hortaliça do excesso de chuva e manter a temperatura pelo efeito estufa, principalmente nos cultivos de inverno no Sul e Sudeste. Adicionalmente, a produtividade e o ciclo de produção aumentam: em um cultivo de inverno em Viçosa – MG, no cultivo protegido a produtividade aumentou em 141% e o número de frutos comerciais em 23%, relativo ao cultivo em campo aberto (Fontes et al., 1997).

No cultivo protegido, podem ocorrer condições ambientais favoráveis a patógenos, como *Botrytis cinerea* Pers.; Fr, agente causal do mofo cinzento ou cancro da haste do tomateiro (Dik & Wubben, 2004). Mais de 200 espécies de plantas são hospedeiras do fungo, o qual, em tomateiro, infecta flores, frutos, folhas e haste (Elad et al., 2004). As infecções podem resultar em desfolha severa, morte de flores (Shtienberg et al., 1998), redução do valor comercial de frutos, lesões nas hastes e consequente morte de plantas (Dik et al., 1999). As lesões em hastes podem se originar de infecções em ferimentos causados pela desfolha e desbrota das plantas e/ou por colonização fúngica a partir do pecíolo (O'Neill et al., 1997; Shtienberg et al., 1998; Dik et

al., 1999). A doença pode causar perdas severas em casa de vegetação, resultar em morte precoce de mais de 70% dos tomateiros (Shtienberg & Elad, 1997) e consequente redução da produtividade (O'Neill et al., 1997).

A alta umidade relativa associada a temperaturas amenas favorece a ocorrência do mofo cinzento (Jarvis, 1989). O efeito da temperatura na infecção da haste foi similar ao reportado para outros órgãos da planta, com o ótimo entre 10 e 20°C, apesar de a infecção poder ocorrer a 5 e 26 °C (O'Neill et al., 1997). A idade da planta e o local de infecção ao longo da haste afetam a susceptibilidade do hospedeiro (Dik & Wubben, 2004), que diminui com o tempo após ocorrer ferimentos (O'Neill et al., 1997). Esses resultados originaram-se de trabalhos em regiões temperadas e, no Brasil, há poucos estudos relacionados ao mofo cinzento. Apesar de a doença já ter sido observada em tomateiros em cultivo protegido próximo a Viçosa, MG (L. A. Maffia, informação pessoal), a maioria dos relatos de ocorrência são do Rio Grande do Sul (Blume & Jara, 2004; Lisboa et al., 2007). Em levantamentos em estufas comerciais no RS, constatou-se a doença em dois de três municípios (Blume & Jara, 2004). Para as autoras, em uma das regiões, a maior incidência de plantas doentes, de agosto a outubro, foi com o mofo cinzento: em outubro, a incidência foi de 55%, mesmo com aplicação de fungicidas.

Com o aumento da área de tomateiro sob cultivo protegido, acredita-se que o mofo cinzento venha a crescer em importância no país. Portanto, a adoção de medidas de manejo da doença é vital para garantir o sucesso do cultivo. Na Unidade de Controle Biológico da UFV, vem-se trabalhando com o biocontrole do mofo cinzento desde a década de 1990, em morangueiro, roseira, eucalipto e, mais recentemente, tomateiro. Em estudos de biocontrole em tomateiro, ocorreram insucessos em vista de problemas com a inoculação de *B. cinerea*. O conhecimento de aspectos metodológicos para sucesso da infecção de tomateiros por *B. cinerea* é

essencial em estudos de manejo da doença. Assim, objetivou-se definir metodologia de trabalho para otimizar a ocorrência da doença a partir de ferimentos em hastes de tomateiro. Especificamente, avaliaram-se: i. a agressividade de isolados de *B. cinerea*; ii. a idade de plantas ideal para inoculação; iii. a suscetibilidade dos tecidos ao longo da haste; iv. a necessidade de câmara úmida para assegurar a infecção; e v. a efetividade de gelatina para a aderência de inóculo do patógeno.

## **2. Material e Métodos**

Executaram-se os experimentos na Unidade de Controle Biológico e casas de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

Usaram-se dois isolados de *B. cinerea*, ToV<sub>1</sub>b, de tomateiro, e MoB1, de morangueiro (aqui referido como M1), obtidos por Nobre et al. (2005). Do isolado ToV<sub>1</sub>b, aqui denominado T0, que desde 2004 estava preservado em discos de micélio pelo método Castellani, depositaram-se os discos em meio de batata dextrose ágar (BDA) em placas e repicou-se o crescimento micelial para tubos. Incubou-se a 20°C e, das bordas de colônias com crescimento ativo, retiraram-se discos de micélio com 1 cm de diâmetro que foram transferidos para ferimentos, realizados com ponta de estilete, em fragmentos de pecíolo de tomateiro com aproximadamente 5 cm de comprimento. Mantiveram-se os fragmentos inoculados sobre tela de nylon e espuma umedecida, em caixas tipo Gerbox, acondicionadas a 20±2°C e 12h de fotoperíodo. Após 5 dias, observou-se esporulação abundante no tecido e, através de isolamento direto, transferiram-se conídios para BDA em tubos, obtendo-se o “sub-isolado” T1. O isolado M1 vinha sendo usado em experimento em morangueiros em casa de vegetação e, através de isolamento direto, foi retirado de frutos com esporulação intensa.

Repicaram-se todos os isolados para BDA em tubos, que foram mantidos a  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 12h de fotoperíodo. Após 12 dias, para obter inóculo, com bastão de vidro retiraram-se os conídios, que foram suspensos em água destilada esterilizada e filtrados em duas camadas de gaze. Ajustou-se a suspensão para  $1 \times 10^5$  conídios.mL<sup>-1</sup>, com auxílio de um hemacitômetro.

Em casa de vegetação a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  semeou-se tomate ‘Santa Clara’ em bandejas de poliestireno expandido (isopor) de 128 células contendo substrato orgânico comercial Tropstrato<sup>®</sup>. Após 25-30 dias, transplantaram-se as mudas para vasos plásticos de 10 cm de diâmetro (1 L), contendo o mesmo substrato. Irrigou-se diariamente, e adubou-se segundo a demanda das plantas.

Efetuararam-se dois experimentos. No primeiro, avaliaram-se os efeitos de isolados do patógeno, idade de tomateiros, altura de inoculação na haste e da presença de câmara úmida na intensidade do mofo cinzento. Para tanto, inoculou-se T0, T1 ou M1 em tomateiros aos 45, 55 ou 65 dias após o semeio, nos terços inferior, médio ou superior das plantas, na presença ou ausência de câmara úmida (algodão umedecido envolto por fita plástica, no local de inoculação, mantido por 24h após a inoculação). Realizaram-se ferimentos retirando-se uma folha, com auxílio de tesoura de poda, aplicando-se 30 µL da suspensão de conídios em cada ferimento.

No segundo experimento, avaliaram-se os efeitos de gelatina, como adotado por Nobre et al. (2005) em folhas, e da presença de câmara úmida no sucesso da inoculação. Considerando-se os resultados obtidos no primeiro experimento, inoculou-se T1 em ferimentos nos terços inferior, médio e superior da haste de tomateiros com 65 dias após o semeio. Na inoculação, aplicaram-se 30 µL da suspensão de conídios de *B. cinerea*, acrescida ou não de gelatina incolor (0,1% p/v), efetuando-se câmara úmida ou não.

Executou-se cada experimento por duas vezes, em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com quatro repetições na primeira execução e três na segunda execução (uma unidade experimental = um tomateiro). Em todas as execuções, mantiveram-se as plantas a  $18\pm 2^{\circ}\text{C}$  e 12h de fotoperíodo em câmara de crescimento. Oito dias após a inoculação, avaliaram-se o comprimento da lesão, a incidência de plantas doentes e a ocorrência de esporulação do patógeno nas lesões.

Transformaram-se os valores de comprimento de lesão em severidade de doença (%), com a equação: (comprimento de lesão de cada unidade experimental/maior comprimento de lesão) x 100. Considerando-se que não houve diferença quanto à homogeneidade de variâncias das duas execuções de cada experimento, eles foram analisados em conjunto. Submeteram-se os valores de severidade à análise de variância (ANOVA) e, quando necessário, compararam-se as médias com o teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Com os resultados de incidência de plantas doentes e de ocorrência de esporulação do patógeno, efetuou-se análise descritiva de frequência. Nas análises estatísticas, usou-se o programa SAS v. 9.1.

### **3.Resultados**

Em ambas as execuções do primeiro experimento, o isolado T0 não causou lesões em qualquer das plantas inoculadas. Portanto, não foi incluído na ANOVA para severidade do mofo cinzento. Não houve efeito significativo da interação quádrupla ( $P=0,7992$ ) nem das triplas ( $P$  sempre maior que 0,1875). Quanto às interações duplas, ocorreu efeito significativo apenas de idade da planta x local de inoculação ( $P<0.0046$ ). Assim, fez-se o desdobramento e a análise dentro de cada fator (Tabela 1).

Em geral, quanto mais velho o tomateiro e mais jovem o tecido da planta (meio e superior da haste), maior a severidade da doença (Tabela 1). Obtiveram-se tendências similares com a

incidência e com a ocorrência de esporulação, principalmente com a inoculação no terço médio da planta (Tabela 2).

Os isolados diferiram quanto à agressividade. Maiores valores de severidade e incidência ocorreram com T1, que também esporulou mais nas lesões (Tabela 2).

A presença de câmara úmida resultou em menor severidade de doença no primeiro experimento e não afetou a severidade no segundo. Também no primeiro experimento, menores valores de incidência e de esporulação ocorreram com a câmara úmida (Tabela 2).

A adição de gelatina à suspensão de inóculo não resultou em aumento da severidade, incidência e nem da esporulação de *B. cinerea* (Tabela 2).

#### **4. Discussão**

Na Unidade de Controle Biológico da UFV, após várias tentativas, não se conseguiu avaliar o biocontrole do mofo cinzento em tomateiro, em vista de insucesso na inoculação de *B. cinerea* em hastes. Anteriormente, inoculou-se o patógeno em folhas (Nobre et al., 2005), o que foi também adotado por outros autores (Audenaert et al., 2002; Akram et al., 2008; Li et al., 2012). Porém, como em cultivo comercial a doença ocorre predominantemente em hastes, e ensaios foliares podem não representar a situação no campo (ten Have et al., 2007) há a necessidade de metodologia reproduzível de inoculação do patógeno. Nesse trabalho, avaliaram-se aspectos importantes em definir essa metodologia em hastes feridas de plantas, mais adotada experimentalmente (O'Neill et al., 1997; Sadfi-zouaoui et al., 2008; Decognet et al., 2010).

Observou-se diferença quanto à agressividade dos isolados testados: T0, originalmente obtido de tomateiro e que estava preservado, não foi agressivo a hastes. Por outro lado, T1, obtido pela inoculação de T0 em folhas de tomateiro e reisolamento, foi mais agressivo que M1. Após preservados por 4 anos em glicerol, areia ou sílica gel, isolados de *B. cinerea* mantiveram a

patogenicidade; vários isolados perderam a resistência a procimidone, para alguns o tamanho de escleródios e a esporulação reduziram-se, independentemente do método de preservação (Delcán et al., 2002). Considerando-se que: i. *B. cinerea* tem alta variabilidade e que vários fatores podem afetar sua agressividade (O'Neill et al., 1997); ii. a variabilidade estatística e biológica em trabalhos pode ser afetada pelo isolado selecionado (Chardonnet et al., 2000); iii. a experiência de Eden et al. (1996), que inocularam isolados em tomates antes do cultivo para produção de esporos, para evitar perda de virulência; e iv. os resultados aqui obtidos, recomenda-se que, antes de se trabalhar com isolados preservados, inoculá-los em tecido vivo. O isolado proveniente de morangueiro foi agressivo, o que não é surpresa, visto a baixa especificidade do patógeno (Nobre, 2003). Por exemplo, O'Neill et al. (1997) usaram isolado obtido de pepineiro em trabalhos de pesquisa com tomateiro. Como já sugerido, antes de se trabalhar com o fungo em tomateiro, deve-se inoculá-lo preferivelmente em tecido da solanácea.

Avaliaram-se, também, outros fatores como idade da planta, local da inoculação e umidade, os quais podem afetar a agressividade do patógeno (O'Neill et al., 1997). No presente trabalho, a severidade da doença aumentou com a idade da planta inoculada, e se obtiveram maiores valores em plantas no início do florescimento, com aproximadamente 65 dias do plantio. Em geral, considera-se que plantas jovens não são muito suscetíveis e que plantas mais velhas são mais comumente infectadas (Dik & Wubben, 2004), apesar de se ter obtido sucesso inoculando-se plantas entre 28 e 120 dias (O'Neill et al., 1997; ten Have et al., 2007). Entretanto, vários autores inocularam plantas em torno de 60 dias do plantio (Aissat et al., 2008; Sadfouzouaoui et al., 2008) e, com inoculação natural, observaram-se os primeiros sintomas aos 64 dias (Lisboa et al., 2007). Considerando-se esses resultados e os obtidos no presente trabalho, recomenda-se inocular tomateiros com pelos menos 65 dias, idealmente próximo à floração.

A altura ao longo da haste também afetou os resultados, e a severidade do mofo cinzento foi maior com a inoculação de *B. cinerea* nos terços médio e superior do tomateiro. A frequência de esporulação do patógeno também foi maior no terço médio. Este fato pode ser explicado pela diferença do estado fisiológico dos tecidos inoculados, pois na porção basal das hastes o grau de lignificação dos tecidos e conseqüentemente a resistência ao patógeno são maiores (Glazener, 1982). Em trabalhos conduzidos com segmentos de hastes, também se obteve menor progresso da infecção em segmentos da base e ápice que nos centrais (ten Have et al., 2007) ou não houve efeito de local quanto à incidência da infecção nem o tamanho da lesão (O'Neill et al., 1997). Apesar desse último resultado conflitante, em vista das informações anteriores e do obtido no presente trabalho, recomenda-se inocular *B. cinerea* principalmente no terço médio de tomateiros.

Maiores valores de severidade, incidência e de frequência de esporulação ocorreram na ausência de câmara úmida. A princípio, esse resultado já observado anteriormente (Eden et al., 1996; O'Neill et al., 1997; Dik et al., 1999), é conflitante, pois a germinação de esporos e infecção são dependentes de água. Entretanto, aparentemente o tecido ferido fornece umidade e nutrientes para germinação e infecção (O'Neill et al., 1997; Dik et al., 1999). É provável, ainda, que a condição de tecido encharcado desfavoreça o crescimento micelial nos tecidos feridos (Shtienberg et al., 1998) e que excesso de umidade possa lavar nutrientes que facilitam a germinação de conídios no ferimento (O'Neill et al., 1997). A expansão subsequente das lesões é dependente do conteúdo de água do tecido colonizado. De qualquer forma, a deposição de gota com conídios do fungo no tecido recém-ferido é suficiente para haver infecção, dispensando o uso de câmara úmida.

Em folhas de tomateiro, a deposição de gotas de suspensão acrescidas de gelatina aumentou o sucesso de infecção de *B. cinerea* (Nobre et al, 2005). No presente trabalho, esse procedimento não aumentou a eficiência da inoculação; a gota de suspensão era pequena (30 µL) e foi colocada imediatamente após o ferimento na haste, o que facilitou a adesão do inóculo.

Como mencionado, objetivou-se definir metodologia reproduzível para inocular *B. cinerea* em tomateiro. Decidiu-se inocular hastes com ferimentos, considerando-se que a importância da infecção desses órgãos (O'Neill et al., 1997), principalmente através de ferimentos resultantes de remoção de folhas e de brotos laterais (O'Neill et al., 1997; Aissat et al., 2008; Decognet et al., 2010). Outros autores avaliaram os resultados entre 4-5 dias (Finkers et al., 2007a; Sadfi-zouaoui et al, 2008) e 8-12 dias (Dik et al., 1999; Finkers et al., 2007b) após a inoculação. No presente trabalho, avaliaram-se a severidade, incidência e esporulação aos 8 dias da inoculação, quando a esporulação do fungo cobria as lesões. Vem-se adotando esses procedimentos em ensaios de biocontrole de *B. cinerea*, inoculando-se o terço médio de plantas aos 65 dias do plantio, sem adoção de câmara úmida. Os resultados têm sido reproduzíveis e tem-se podido comparar a eficiência de tratamentos. Portanto, espera-se contribuir com outros pesquisadores que venham a trabalhar com o mofo cinzento do tomateiro.

## Referências

Aissat K, Nicot PC, Guechi A, Bardin M, Chibane M (2008) Grey mould development in greenhouse tomatoes under drip and furrow irrigation. *Agronomy for Sustainable Development* 28: 403-409.

Akram A, Ongena M, Duby F, Dommès J, Thonart P (2008) Systemic resistance and lipoxygenase-related defence response induced in tomato by *Pseudomonas putida* strain BTP1. *BMC Plant Biology* 8:113.

Audenaert K, Meyer GB, Höfte MM (2002) Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiology* 128: 491-501.

Blume E, Jara ASA (2004) Moléstias em tomateiro cultivado em estufas plásticas em quatro municípios da região central do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural* 34: 661-666.

Chardonnet CO, Sams CE, Trigiano RN, Conway WS (2000) Variability of three isolates of *Botrytis cinerea* affects the inhibitory effects of calcium on this fungus. *Phytopathology* 90: 769-774.

Decognet V, Ravetti F, Martin C, Nicot PC (2010) Improved leaf pruning reduces development of stem cankers caused by grey mould in greenhouse tomatoes. *Agronomy for Sustainable Development* 30: 465–472.

Delcán J, Moyano C, Raposo R, Melgarejo P (2002) Storage of *Botrytis cinerea* using different methods. *Journal of Plant Pathology* 84: 3-9.

Dik AJ, Koning G, Kohl J (1999) Evaluation of microbial antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* stem infection in cucumber and tomato. *European Journal of Plant Pathology* 105: 115–122.

Dik AJ, Wubben JP (2004) Epidemiology of *Botrytis cinerea* diseases in greenhouses. In: Elad Y, Williamson B, Tudzinski P, Delen N (Eds) *Botrytis: biology, pathology and control*. The Netherlands. Kluwer Academic Publishers. pp. 319-331.

Eden MA, Hill RA, Beresford R, Stewart A (1996) The influence of inoculum concentration, relative humidity, and temperature on infection of greenhouse tomatoes by *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology* 45: 795-806.

Elad Y, Williamson B, Tudzinski P, Delen N (2004) *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems – an introduction. In: Elad Y, Williamson B, Tudzinski P, Delen N (Eds) *Botrytis: biology, pathology and control*. The Netherlands. Kluwer Academic Publishers. pp. 1-6.

Filgueira FAR (2008) Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3<sup>th</sup> Ed. Viçosa. UFV.

Finkers R, van den Berg P, van Berloo R, ten Have A, van Heusden AW, van Kan JAL, Lindhout P (2007a) Three QTLs for *Botrytis cinerea* resistance in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 114: 585-593.

Finkers R, van Heusden AW, Meijer-Dekens F, van Kan JAL, Maris P, Lindhout P (2007b) The construction of a *Solanum habrochaites* LYC4 introgression line population and the identification of QTLs for resistance to *Botrytis cinerea*. *Theoretical and Applied Genetics* 114: 1071-1080.

Fontes PCR, Dias EM, Zanin SR, Finger FL (1997) Produção de cultivares de tomate em estufa coberta com plástico. *Revista Ceres* 44: 152-160.

- Glazener JA (1982) Accumulation of phenolic compounds in cells and formation of lignin-like polymers in cell walls of young tomato fruits after inoculation with *Botrytis cinerea*. *Physiological Plant Pathology* 20: 11-25.
- Goto R, Tivelli SW (1998) Produção de hortaliças em ambiente protegido: condições subtropicais. São Paulo. UNESP.
- Jarvis WR (1989) Managing diseases in greenhouse crops. *Plant Disease* 73: 190–194.
- Li L, Li T, Xu T, Qi M, Yu Z, Zhang K (2012) Role of calcium in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) resistance to *Botrytis cinerea*. *African Journal of Biotechnology* 11: 9013-9022.
- Lisboa BB, Bochese CC, Vargas LK, Siveira JRP, Radin B, Oliveira AMR (2007) Eficiência de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride* na redução da incidência de *Botrytis cinerea* em tomateiro cultivado sob ambiente protegido. *Ciência Rural* 37: 1255-1260.
- Martins G (1992) Uso de casa-de-vegetação com cobertura plástica na tomaticultura de verão. PhD Thesis, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Jaboticabal SP, Brasil.
- Nobre SAM (2003) Isolados brasileiros de *Clonostachys rosea* com potencial para biocontrole de *Botrytis cinerea*. PhD Thesis, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa MG, Brasil.
- Nobre SAM, Maffia LA, Mizubuti ESG, Cota LV, Dias APS (2005) Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. *Biological Control* 34: 132-143.
- O'Neill TM, Shtienberg D, Elad, Y (1997) Effect of some host and microclimate factors on infection of tomato stems by *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 81: 36-40.
- Sadfi-Zouaoui N, Hannachi I, Andurand D, Essghaier B, Boudabous A, Nicot P (2008) Biological control of *Botrytis cinerea* on stem wounds with moderately halophilic bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 2871-2877.
- Shtienberg D, Elad Y (1997) Incorporation of weather forecasting to integrated, chemical-biological management of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 87: 332–340.
- Shtienberg D, Elad Y, Ariela Niv, Nitzani Y, Kirshner B (1998) Significance of leaf infection by *Botrytis cinerea* in stem rotting of tomatoes grown in non-heated greenhouses. *European Journal of Plant Pathology* 104: 753-763.
- ten Have A, van Berloo R, Lindhout P, van Kan JAL (2007) Partial stem and leaf resistance against the fungal pathogen *Botrytis cinerea* in wild relatives of tomato. *European Journal of Plant Pathology* 117:153-166.

Yildiz F, Yildiz M, Delen N, Coskuntuna A, Kinay P, Turkusay H (2007) The effects of biological and chemical treatment on gray mold disease in tomatoes grown under greenhouse conditions. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 31: 319-325.

Tabela 1. Severidade (%) do mofo cinzento em tomateiros inoculados com *Botrytis cinerea* em diferentes dias após o plantio (idades) e alturas das hastes. Médias de sete repetições (executou-se o experimento por duas vezes, a primeira com quatro repetições e a segunda com três).

Inoculação no terço	Idade de tomateiros		
	65	55	45
Médio	48,2 Aa*	19,0 Ba	18,3 Ba
Superior	34,0 Aa	16,5 ABa	10,7 Bab
Basal	10,0 Ab	9,1 Aa	3,3 Ab

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si (Teste de Tukey,  $\alpha=0,05$ ).

Tabela 2. Severidade (%) e incidência (%) do mofo cinzento e hastes de tomateiro com esporulação de *Botrytis cinerea* (%). Os valores de severidade são médias, os de incidência e de esporulação são frequências; esses valores provieram de dois experimentos, cada um executado por duas vezes (no primeiro experimento, n= 120 por isolado e câmara úmida; 80 por idade e altura; no segundo, n=36 por gelatina e câmara úmida; 24 por altura).

Experimento	Fator	Níveis do fator	Severidade	Incidência	Esporulação
1	Isolado	T1	26,8 a <sup>*1</sup>	66,1	52,2
		M1	11,5 b <sup>*1</sup>	39,2	30,0
1	Idade (dias)	65	Tabela 1 <sup>*2</sup>	73,5	55,4
		55	Tabela 1	50,6	49,4
		45	Tabela 1	30,6	15,3
1	Câmara úmida	Não	23,1 a <sup>*3</sup>	65,6	55,5
		Sim	15,1 b <sup>*3</sup>	39,5	26,9
2		Não	36,9 a <sup>*4</sup>	75,0	61,1
		Sim	36,5 a <sup>*4</sup>	81,8	63,9
1	Altura	Meio	Tabela 1	70,9	60,8
		Topo	Tabela 1	53,2	35,4
		Base	Tabela 1	33,8	27,5
2		Meio	50,3 a <sup>*5</sup>	100,0	87,5
		Topo	38,2 ab <sup>*5</sup>	70,8	54,2
		Base	22,2 b <sup>*5</sup>	65,2	45,8
2	Gelatina	Sim	37,6 a <sup>*6</sup>	79,4	61,1
		Não	35,8 a <sup>*6</sup>	77,1	63,9

\*1 - médias de isolados diferiram entre si (P<0,00001).

\*2 - os fatores idade e dias interagiram significativamente; ver Tabela 1.

\*3 - médias de câmara úmida diferiram entre si (P<0,0032).

\*4 - sem efeito significativo de câmara úmida (P= 0,9969).

\*5 - médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si (Teste de Tukey,  $\alpha=0,05$ ).

\*6 - sem efeito significativo de gelatina (P= 0,8076).

## CAPÍTULO 2

### *Clonostachys rosea* no biocontrole do mofo cinzento em tomateiro

#### **Resumo**

No Brasil, com a expansão do cultivo protegido do tomateiro, onde ocorrem condições favoráveis a *Botrytis cinerea*, espera-se aumentar a ocorrência do mofo cinzento. Uma das medidas de controle da doença é o controle biológico. Em trabalhos anteriores, selecionaram-se quatro isolados de *Clonostachys rosea* eficientes em suprimir *B. cinerea* em folhas de tomateiro. Essa condição não representa a situação no campo, pois o patógeno infecta, predominantemente, ferimentos provocados pela desbrota do tomateiro durante os tratos culturais. Assim, buscou-se avaliar a eficiência dos quatro isolados de *C. rosea*, em hastes destacadas e em plantas, no biocontrole de *B. cinerea*. Buscou-se, também, avaliar fatores que aumentem a eficiência do antagonista, como: i - época de aplicação; ii - concentração de conídios; iii - aplicação individual ou em mistura. Os quatro isolados de *C. rosea* foram eficientes em controlar o mofo cinzento, podendo ser aplicados individualmente ou em mistura. Maior eficiência foi com a aplicação do antagonista até um dia após a desbrota do tomateiro e em concentração a partir de  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>. O antagonista tem potencial de uso em tomateiros sob cultivo protegido no Brasil, principalmente no contexto do manejo integrado.

## 1. Introdução

O tomateiro é cultivado na maioria dos estados brasileiros, sendo a segunda hortaliça mais produzida no país (Filgueira, 2008). Como para outras hortaliças, o cultivo de tomate em ambiente protegido vem aumentando no país. O ambiente protegido altera as condições de temperatura e umidade, que são controladas pela ventilação lateral das estufas, podendo favorecer a ocorrência de doenças. Dentre essas, tem-se o mofo cinzento causado por *Botrytis cinerea*, uma das doenças de controle mais difícil em ambiente protegido. O patógeno pode causar desfolha severa, morte das flores (Shtienberg, et al., 1998), redução do valor comercial dos frutos, cancos nas hastes e consequente morte das plantas (Dik et al., 1999). O fungo pode infectar flores, frutos, folhas e hastes do tomateiro, onde penetra diretamente ou ferimentos causados por práticas culturais (Elad et al., 2004). As lesões ocorrem, principalmente, em hastes (O'Neill et al., 1997), podendo se desenvolver de duas maneiras: i) infecções através de ferimentos causados pela desfolha e desbrota das plantas; ii) infecções dos folíolos que, através do pecíolo, podem atingir a haste (O'Neill et al., 1997; Shtienberg et al., 1998). Considerando-se que o mofo cinzento pode causar mais de 70% de perdas (Shtienberg & Elad, 1997), os produtores investem muito no controle da doença.

O controle do mofo cinzento é difícil e dispendioso (Dik et al., 1999), baseando-se, principalmente, na aplicação de fungicidas. Há vários relatos de ocorrência de populações resistentes a fungicidas (Korolev et al., 2009; Myresiotis et al., 2008), e o controle biológico surge como alternativa ao uso de fungicidas. Há vários relatos de sucesso com o uso de antagonistas visando o biocontrole de *B. cinerea* em ambiente protegido (Eden et al., 1996; Dik et al., 1999; Elmer & Reglinski, 2006; Yildiz et al., 2007), inclusive com *C. rosea* (Sutton et al., 1997, 2002; Jensen et al., 2002; Silvera-Pérez et al., 2010). Nessas condições de áreas pequenas,

com alta densidade de plantas e fatores climáticos mais estáveis, aumenta-se a possibilidade da eficiência no uso de agentes de biocontrole (Paulitz & Belanger, 2001).

*Clonostachys rosea* (Link: Fr.) Schroers, Samuels, Seifert & W. Gams é antagonista, eficiente no controle do mofo cinzento em diversas culturas em campo e ambiente protegido (Chatterton & Punja, 2012; Zaldúa & Sanfuentes, 2010; Cota et al., 2008). Na busca por isolados de *C. rosea* adaptados às condições brasileiras, na Universidade Federal de Viçosa (UFV) selecionaram-se quatro isolados que suprimiram *B. cinerea* em folhas de tomateiro (Nobre et al., 2005). Estes isolados também foram eficientes no campo, reduzindo a incidência do patógeno em morango, tanto quanto a aplicação dos fungicidas procimidone e captan (Cota et al., 2008).

Sabe-se que o mofo cinzento em tomateiro ocorre predominantemente em hastes, e ensaios foliares podem não representar a situação no campo (ten Have et al., 2007). Portanto, apesar de os isolados de *C. rosea* selecionados na UFV terem colonizado folhas, onde reduziram a infecção de *B. cinerea*, ainda não se tinha testado a eficiência destes em segmentos de haste do tomateiro ou em plantas em casa de vegetação após desbrota, simulando as condições de cultivo comercial. Assim, relacionando-se ao controle de *B. cinerea* em tomateiro, objetivou-se avaliar: i) a eficiência de *C. rosea*; ii) épocas de aplicação do antagonista; iii) o efeito da aplicação individual ou em mistura dos isolados e; iv) o efeito da concentração de conídios do antagonista.

## **2. Material & Métodos**

### **2.1. Procedimentos gerais**

Executaram-se os experimentos na Unidade de Controle Biológico (UCB) e casas de vegetação do Departamento de Fitopatologia da UFV.

Do isolado ToV<sub>1b</sub>, que estava preservado desde 2004 em discos de micélio pelo método Castellani, depositaram-se os discos em meio de batata dextrose ágar (BDA) em placas de Petri. Incubou-se a 20°C, fotoperíodo de 12 h e, das bordas da colônia com crescimento ativo, retiraram-se discos de micélio com 1 cm de diâmetro que foram transferidos para ferimentos, realizados com ponta de estilete, em fragmentos de pecíolo de tomateiro com aproximadamente 5 cm de comprimento. Mantiveram-se os fragmentos inoculados sobre tela de nylon e espuma umedecida, em caixas tipo Gerbox, acondicionadas a 20°C e fotoperíodo de 12h Após 5 dias, observou-se esporulação abundante sobre o tecido e, através de isolamento direto, transferiram-se conídios para BDA em tubos. Repicou-se para BDA em tubos, que foi mantido a 20°C, 12 h de fotoperíodo. Para obtenção de inóculo, após 12 dias, suspenderam-se conídios em água destilada esterilizada (ADE), com auxílio de bastão de vidro, filtrando-os em duas camadas de gaze. Para as inoculações, ajustou-se a suspensão para  $1 \times 10^5$  conídios.mL<sup>-1</sup>, com auxílio de um hemacitômetro. Posteriormente, depositou-se uma gota de 30 µL da suspensão de *B. cinerea* no ápice de segmentos de hastes ou em ferimentos em plantas.

Para segmentos de hastes, retiraram-se fragmentos de aproximadamente 8 cm nos terços inferior, médio e superior de hastes de tomateiros e, em cada segmento, fez-se o corte superior em bisel para facilitar inoculação/aplicação. Usou-se metodologia proposta por O'Neill et al. (1997) com modificações. Em ferimentos, retirou-se um broto no terço superior e/ou uma folha no terço médio da planta, simulando a desbrota, com auxílio de tesoura de poda.

Usaram-se quatro isolados de *C. rosea* - NCR19/F, NCR60/F, NCR61/F e NCR62/F. Para produção de inóculo, após 12 dias de cultivo em meio BDA, a 25 °C e fotoperíodo de 12 h, suspenderam-se os conídios do antagonista em ADE, filtrando-os em duas camadas de gaze. Para as aplicações, ajustou-se a suspensão para  $1 \times 10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> com o auxílio de um

hemacitômetro para os experimentos 2.2 e 2.4. No experimento 2.3, ajustaram-se as concentrações de *C. rosea* de acordo com os tratamentos. Com exceção do experimento 2.4, aplicou-se o antagonista em mistura, depositando-se uma gota de 30 µL da suspensão de *C. rosea* no ápice de segmentos de hastes ou em ferimentos em planta. Como testemunha, aplicou-se ADE nos segmentos de haste ou em plantas.

Em casa de vegetação a  $25 \pm 2$  °C semeou-se tomate ‘Santa Clara’ em bandejas de poliestireno expandido (isopor) de 128 células contendo substrato orgânico comercial Tropstrato<sup>®</sup>. Após 25-30 dias, transplantaram-se as mudas para vasos plásticos de 17,5 cm de diâmetro (2 L), contendo o mesmo substrato. Irrigou-se diariamente e adubou-se segundo a demanda da cultura.

Para a avaliação, quantificou-se, diariamente, até 8 dias após a inoculação do patógeno, a incidência, a severidade da doença, dada pelo comprimento de lesão, e a intensidade do tecido necrótico com esporulação. Para tal, adotou-se uma escala de nota adaptada de O'Neill et al., (1997): 0 = sem esporulação; 1 = 0-25%; 2 = 25-50%; 3 = 50-75%; 4 = 75-100% com esporulação. No experimento 2.3, fez-se a avaliação somente no oitavo dia.

Para as análises, considerando-se que não houve diferença quanto à homogeneidade de variâncias entre as execuções de cada experimento, analisaram-se esta em conjunto. Analisaram-se a eficiência de *C. rosea* em reduzir a doença (porcentagem de redução do comprimento de lesão em relação à média do tratamento no qual se aplicou somente *B. cinerea*) aos 8 dias após a inoculação do patógeno, a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e/ou a severidade da doença (comprimento da lesão, em cm, aos 8 dias após inoculação com patógeno). Realizou-se somente análise descritiva dos experimentos, pois se observou baixa incidência da doença, em consequência da eficiência do biocontrole de *B. cinerea* pelos isolados de *C. rosea*.

Para os experimentos 2.2.1 e 2.2.2 efetuaram-se análises descritivas para os dados de incidência da doença. Efetuou-se a análise de correlação de Spearman entre o comprimento de lesão e a porcentagem de tecido doente com esporulação para os experimentos. Nas análises estatísticas, usou-se o programa SAS v. 9.1.

## **2.2. Biocontrole de *Botrytis cinerea***

### **2.2.1. Segmentos de hastes**

Após inoculação de *B. cinerea* e aplicação de *C. rosea* ou ADE nos segmentos de hastes, acondicionaram-se os segmentos em caixas tipo Gerbox sobre tela de nylon e espuma umedecida, sendo três segmentos de haste, terço inferior, médio e superior, por Gerbox, mantendo-os a 18°C.

Aplicou-se o antagonista ou ADE em cinco épocas relacionadas à inoculação de *B. cinerea*: 5 dias antes ou após, 1 dia antes ou após ou simultaneamente.

Executou-se o experimento por três vezes, em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial, com três repetições nos dois primeiros e quatro na terceira execução (uma unidade experimental = um segmento de haste).

### **2.2.2. Plantas inteiras**

Após a inoculação de *B. cinerea* e a aplicação de *C. rosea* ou ADE nos ferimentos, mantiveram-se as plantas em câmara de crescimento a 18°C. Aplicou-se o antagonista ou ADE em três épocas relacionadas à inoculação de *B. cinerea*: 5 dias antes, 1 dia antes ou simultaneamente.

Executou-se o experimento por duas vezes, em DIC, em esquema fatorial, com três repetições no primeiro e quatro na segunda execução (uma unidade experimental = uma planta).

## **2.3. Concentração de conídios de *Clonostachys rosea***

### **2.3.1. Segmentos de hastes**

Após inoculação de *B. cinerea* e aplicação de *C. rosea* simultaneamente, acondicionaram-se os segmentos de hastes em caixas tipo Gerbox sobre tela de nylon e espuma umedecida, sendo dois segmentos por Gerbox, mantendo-os a 18°C. Por diluições sucessivas, usaram-se cinco concentrações (tratamentos) de *C. rosea* a partir de uma suspensão inicial de  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  conídios.mL<sup>-1</sup> e ADE.

Executou-se o experimento por três vezes, em DIC, com três repetições (uma unidade experimental = um Gerbox).

### **2.3.2. Plantas inteiras**

Após a inoculação com *B. cinerea* e a aplicação de *C. rosea* simultaneamente, mantiveram-se as plantas em câmara de crescimento a 18°C. Usaram-se os mesmos tratamentos que no experimento 2.3.1.

Executou-se o experimento por duas vezes, em DIC, com quatro repetições (uma unidade experimental = uma planta).

## **2.4. *Clonostachys rosea* aplicado em mistura ou individualmente**

### **2.4.1. Segmentos de hastes**

Os tratamentos foram os quatro isolados aplicados individualmente ou em mistura e ADE. Após inoculação de *B. cinerea* e aplicação de *C. rosea* simultaneamente, acondicionaram-se os segmentos em caixas tipo Gerbox sobre tela de nylon e espuma umedecida, sendo dois segmentos por Gerbox, mantendo-os a 18°C.

Executou-se o experimento por duas vezes, em DIC, com cinco repetições (uma unidade experimental = um Gerbox).

### **2.4.2 Plantas inteiras**

Após a inoculação de *B. cinerea* e a aplicação de *C. rosea* ou ADE simultaneamente, mantiveram-se as plantas em câmara de crescimento a 18°C. Usaram-se os mesmos tratamentos que no experimento 2.4.1.

Executou-se o experimento por duas vezes, em DIC, com cinco repetições (uma planta = uma unidade experimental).

### **3. Resultados**

Para todos os experimentos, o comprimento de lesão correlacionou-se positiva e significativamente ( $r$  entre 0.75 e 0.97,  $P$  sempre menor que 0.0001) com a porcentagem de tecido doente com esporulação.

#### **3.1. Biocontrole de *Botrytis cinerea***

Em segmentos de hastes, a incidência do mofo cinzento foi de 18.2% com aplicação do antagonista e 46.6 sem o antagonista, em plantas foi de 6.2% com o antagonista e de 92.8% sem o antagonista. Em segmentos de hastes, a eficiência de biocontrole foi de aproximadamente 100, 100, 50 ou 10%, aplicando-se o antagonista 1 dia antes, simultaneamente, 1 dia após ou 5 dias após a inoculação do patógeno, respectivamente (Fig 1A). Não se observaram lesões nos segmentos quando se inoculou *B. cinerea* 5 dias após se efetuarem os ferimentos. Em plantas, a eficiência de biocontrole foi maior que 90% independentemente da época e do local de aplicação do antagonista (Fig 1B). Nas plantas-testemunha, observou-se aproximadamente 5% de incidência (dados não mostrados).

#### **3.2. Concentração de conídios de *Clonostachys rosea***

*Clonostachys rosea* foi eficiente em reduzir a severidade da doença na concentração acima de  $10^5$  e  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> para segmentos de hastes e plantas, respectivamente.

Para a aplicação em segmentos de hastes, em todas as concentrações a severidade e a AACPD reduziram-se, mas não houve diferença para as concentrações de  $10^2$ ,  $10^3$  e  $10^4$  conídios.mL<sup>-1</sup>. Quando não se aplicou o antagonista, observaram-se médias de 1.93 cm e 3.91 cm.dia para severidade e AACPD, respectivamente. Quando se aplicaram  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>, as médias de severidade e de AACPD foram nulas (Fig 2A).

Em plantas, quando não se aplicou o antagonista, observaram-se médias de 5.45 cm e 10.55 cm.dia para severidade e AACPD, respectivamente. Quando se aplicou o antagonista na concentração de  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> as médias foram de 0.81 cm e 0.92 cm.dia para severidade e AACPD, respectivamente (Fig 2B).

### **3.3. *Clonostachys rosea* aplicado em mistura ou individualmente**

Os isolados, individualmente ou em mistura, foram 100% eficientes em controlar o mofo cinzento do tomateiro em segmentos de hastes, exceto o isolado NCR61/F com eficiência de 94.8%. Em plantas, a eficiência de controle foi de 50, 70, 55, 65 e 52%, para os isolados NCR19/F, NCR60/F, NCR61/F, NCR62/F e a mistura destes, respectivamente (Fig 3). A média de AACPD quando se inoculou somente o patógeno foi de 10.77 cm.dia e com aplicação dos isolados de *C. rosea* as médias variaram de 2.87 a 4.09 cm.dia. Observaram-se lesões no tratamento em que se fez somente a aplicação de ADE com média de AACPD de 3.72 cm.dia (tabela 1).

## **4. Discussão**

Considerando-se a importância potencial do mofo cinzento em cultivos protegidos de tomateiro no Brasil, iniciou-se a avaliação de biocontrole da doença com *C. rosea*. O antagonista foi eficiente em reduzir a intensidade (incidência e severidade) da doença em segmentos de haste

e em plantas. Esses resultados corroboram os resultados obtidos por outros autores (Shafia et al., 2001; Sutton et al., 2002; Lisboa et al., 2007).

Verificou-se que a incidência da doença foi nula quando o patógeno foi inoculado cinco dias após o ferimento. Em experimentos preliminares, visando padronizar a metodologia de inoculação do patógeno, este fato já havia sido observado em plantas (Cap. 1). Provavelmente, pode ter ocorrido a cicatrização do tecido, considerando-se a umidade fornecida pelo tecido ferido, aparentemente possibilita a germinação e a infecção (O'Neill et al., 1997; Dik et al., 1999). Assim, a cicatrização reduz a umidade impedindo a germinação dos conídios, além de formar barreira à penetração do patógeno, em vista da deposição de calose. Adicionalmente, acredita-se que nutrientes exógenos do tecido da planta são requeridos para a germinação, desenvolvimento e infecção dos tecidos por *B. cinerea* (Huang et al., 2000). Em hastes, *C. rosea* foi eficiente quando aplicado um dia antes, simultaneamente e um dia após, e ineficiente no controle da doença quando aplicado cinco dias após inoculação do patógeno. Em plantas, o antagonista foi eficiente quando aplicado simultaneamente, um dia ou cinco dias após a inoculação do patógeno. A competição por espaço e nutrientes é um dos principais mecanismos de antagonismo de *C. rosea* a *B. cinerea* (Morandi et al., 2003). Assim, é possível que o antagonista colonize primeiro e mais eficientemente o tecido do hospedeiro, impedindo a infecção pelo patógeno. Sabe-se que *B. cinerea* torna-se mais agressivo em tecidos senescentes ou após estresse causado por algum fator ambiental (Sutton et al., 2002; Shafia et al., 2001). Isso pode explicar porque em segmentos de hastes, reduziu-se a eficiência do antagonista quando aplicado um dia após e não houve eficiência quando aplicado cinco dias após a inoculação do patógeno. O ferimento causado em hastes e o estresse pela remoção do tecido podem tornar as condições mais favoráveis a *B. cinerea*. Assim, com um dia após a inoculação, aparentemente,

inicia-se o processo infeccioso e aos cinco dias o patógeno já coloniza o tecido. Sutton et al. (2002) observaram que *C. rosea* pode suprimir a doença quando aplicado em ferimentos de haste de tomateiro até 48 h após a lesão. Os isolados de *C. rosea* usados nesse estudo, também foram eficientes em reduzir o comprimento de lesões, independente do local de aplicação. Mesmo somente com a inoculação de *B. cinerea*, não se observou doença nos segmentos basais de hastes ou no terço inferior em planta, semelhante ao já observado (ten Have et al., 2007). Possivelmente, porque as regiões basais, com tecido mais velho, sejam mais lignificadas e conseqüentemente a resistência ao patógeno é maior (Glazener, 1982). Apesar da redução da incidência com aplicação de *C. rosea* até cinco dias após a inoculação do patógeno, recomenda-se a aplicação do antagonista até um dia após a desbrota da cultura, pois como já relatado (Sutton et al., 2002; Shafia et al., 2001), a senescência ou estresse pode afetar a agressividade do patógeno. Observou-se em outros experimentos (dados não mostrados) e em segmentos de hastes que a aplicação do antagonista pode ser ineficiente se aplicado atrasado em relação ao patógeno.

Avaliaram-se também outros fatores, como o efeito individual de cada isolado e a concentração de conídios, os quais podem afetar a eficiência do controle (Sutton et al., 1997). Como *C. rosea* atua por competição por espaço e nutrientes no tecido ferido (Yu & Sutton, 1997), sua eficiência em colonizar o hospedeiro pode depender da concentração de conídios na superfície ferida. Apesar de ter sido observado tendência a uma correlação linear positiva entre a concentração de conídios e o controle da doença, maior controle foi nas concentrações acima de  $10^5$  em hastes e  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> em tomateiros. O aumento na concentração de conídios provavelmente favoreceu o estabelecimento e colonização do antagonista no tecido ferido em relação ao patógeno. Nobre et al. (2003), testando os mesmos isolados no controle do mofo cinzento em folhas de tomateiro, observaram que a concentração de  $10^3$  conídios.mL<sup>-1</sup> do

antagonista foi suficiente para suprimir a esporulação do patógeno. Entretanto, em outros hospedeiros (morangueiro, eucalipto e roseira) a concentração de conídios do antagonista, necessária para suprimir o patógeno, foi dependente do isolado e do hospedeiro. Outros autores também observaram o efeito da concentração do inóculo de *C. rosea*. Maior intensidade de colonização por *C. rosea* em hastes de tomateiros desfolhados foi com a aplicação de  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>, que coincidiu com a menor esporulação do patógeno (Sutton et al., 2002). Testou-se a concentração de conídios de produto formulado à base do isolado ACM941 de *C. rosea* no controle de *Fusarium* spp. em trigo (Eden et al., 1996). Os autores testaram sete concentrações, de  $10^4$  a  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>, e houve efeito significativo para concentrações acima de  $8 \times 10^6$  ou  $3 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> em casa de vegetação ou campo, respectivamente. O efeito de concentração de conídios também ocorre com outros agentes de biocontrole. A atividade de biocontrole de fungos filamentosos foi melhor com  $10^8$  conídios.mL<sup>-1</sup> que a  $10^7$ ,  $10^6$  ou  $10^5$  e a eficiência reduziu-se com o aumento da concentração do patógeno (Eden et al., 1996). Recomenda-se o uso de *C. rosea* na concentração de  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> ao se fazer a desbrota do tomateiro em casa de vegetação.

Considerando que os isolados vieram de diferentes hospedeiros, esperava-se que tivessem diferentes requerimentos fisiológicos. Portanto, avaliaram-se estes isolados individualmente ou em mistura. Em geral, a incidência do mofo cinzento em hastes foi nula, exceto para o isolado NCR61/F, em que a severidade da doença reduziu-se em 95%. Em plantas, todos os isolados ou a mistura foram eficientes em reduzir a severidade da doença em mais de 50%. Apesar de ter ocorrido lesões nas plantas tratadas com *C. rosea*, a intensidade de doença foi semelhante à obtida quando aplicou-se somente ADE. Outros autores também observaram em segmentos de hastes a incidência do mofo cinzento no controle, variando de 5 a 16.7% (Eden et al., 1996; Dik et al. 1999). Segundo os autores, esse fato ocorre pela transmissão de conídios do patógeno por

insetos presentes na casa de vegetação. Entretanto, não se pode descartar a hipótese de uma infecção quiescente, podendo o patógeno ter se manifestado quando as condições foram favoráveis ao seu desenvolvimento, após a desbrota da planta ou corte do segmento de haste. Em trabalho anterior, Nobre et al. (2003) observaram que estes mesmos isolados foram igualmente eficientes em colonizar folhas de tomateiros e de suprimir nelas a esporulação de *B. cinerea*; porém, para outras plantas, a eficiência variou com o isolado. Outros autores também relataram que a eficiência de controle é dependente do isolado usado. Avaliou-se o uso de dois isolados de *C. rosea*, *Cr* IK726 e *Cr* 201, quanto à eficiência em controlar o mofo cinzento em roseiras (Yohalem, 2004). Para os autores, os dois isolados reduziram a incidência e esporulação do patógeno, mas o isolado *Cr* 201 foi mais eficiente. Dois isolados de *C. rosea*, UDC-A10 e UDC-A11, reduziram a mortalidade de mini-estacas de eucalipto, causada por *B. cinerea*, em 54 e 71%, respectivamente, efeito similar aos dos fungicidas captan e iprodione (Zaldúa & Sanfuentes, 2010). Usaram-se três isolados de *C. rosea* para o controle do mofo cinzento na produção de mudas de fúcsia, os quais reduziram a incidência da doença; a redução também variou com o isolado usado (Silvera-Pérez et al., 2010).

Como mencionado, sabendo-se da eficiência dos isolados selecionados em condições brasileiras no controle de *B. cinerea* em diferentes culturas, inclusive em folhas de tomateiro (Nobre et al., 2005; Cota 2008), objetivou-se testar a eficiência destes em haste de tomateiro, simulando os tratamentos culturais aplicados à cultura e as condições em que a doença ocorre. Buscou-se, também, avaliar os fatores que poderiam influenciar na eficiência, como época de aplicação, concentração de conídios e a aplicação individual de cada isolado. Os quatro isolados selecionados foram eficientes no controle do mofo cinzento em hastes e em plantas do tomateiro, podendo ser usado no manejo da doença. Recomenda-se a aplicação do antagonista até um dia

após a desbrota. A concentração de conídios ideal é a partir de  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>, podendo-se aplicar a mistura ou os isolados individualmente. Sabendo que é difícil e dispendioso o controle do mofo cinzento em casa de vegetação, espera-se desenvolver um produto com estes isolados, aumentando a disponibilidade de estratégias que auxiliam no manejo integrado da doença.

## Referências

- Chatterton S, Punja ZK (2012) Colonization of geranium foliage by *Clonostachys rosea* f. *catenulate*, a biological control agent of botrytis grey mould. *Botany* 90: 1-10.
- Cota LV, Maffia LA, Mizubuti ESG, Macedo PEF, Antunes RF (2008) Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. *Biological Control* 46: 515-522.
- Dik AJ, Koning G, Kohl J (1999) Evaluation of microbial antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* stem infection in cucumber and tomato. *European Journal of Plant Pathology* 105: 115–122.
- Eden MA, Hill RA, Beresford R, Stewart A (1996) The influence of inoculum concentration, relative humidity, and temperature on infection of greenhouse tomatoes by *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology* 45: 795-806.
- Elad Y, Williamson B, Tudzinski P, Delen N (2004) *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems – an introduction. In: Elad Y, Williamson B, Tudzinski P, Delen N (Eds) *Botrytis: biology, pathology and control*. The Netherlands. Kluwer Academic Publishers. pp. 1-6.
- Elmer PAG, Reglinski T (2006) Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology* 55: 155-177.
- Filgueira FAR (2008) Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3th Ed. Viçosa. UFV.
- Glazener JA (1982) Accumulation of phenolic compounds in cells and formation of lignin-like polymers in cell walls of young tomato fruits after inoculation with *Botrytis cinerea*. *Physiological Plant Pathology* 20: 11-25.
- Huang HC, Acharya SN, Erickson RS (2000) Etiology of alfalfa blossom blight caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology* 9: 11-16.
- Jensen B, Knudsen IMB, Jensen DF (2002) Survival of conidia of *Clonostachys rosea* on stored barley seeds and their biocontrol efficacy against seed-borne *Bipolaris sorokiniana*. *Biocontrol Science and Technological* 12: 427–41.

- Korolev N, Mamiev M, Zahavi T, Elad Y (2009) Resistance to fungicides among *Botrytis cinerea* isolates from tomato and other hosts in Israel. 2nd International Symposium on Tomato Diseases 808: 367-375.
- Lisboa BB, Bochese CC, Vargas LK, Siveira JRP, Radin B, Oliveira AMR (2007) Eficiência de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride* na redução da incidência de *Botrytis cinerea* em tomateiro cultivado sob ambiente protegido. *Ciência Rural* 37: 1255-1260.
- Morandi MAB, Maffia LA, Mizubuti ESG, Alfenas AC, Barbosa JG (2003) Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: a valuable component in Botrytis blight management in commercial greenhouses. *Biological Control* 26: 311–317.
- Myresiotis CK, Bardas GA, Karaoglanidis GS (2008) Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* to pyraclostrobin and boscalid and control of anilinopyrimidine- and benzimidazole-resistant strains by these fungicides. *Plant Disease* 92: 1427-1431.
- Nobre SAM (2003) Isolados brasileiros de *Clonostachys rosea* com potencial para biocontrole de *Botrytis cinerea*. PhD Thesis, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa MG, Brasil.
- Nobre SAM, Maffia LA, Mizubuti ESG, Cota LV, Dias APS (2005) Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. *Biological Control* 34: 132-143.
- O'Neill TM, Shtienberg D, Elad, Y (1997) Effect of some host and microclimate factors on infection of tomato stems by *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 81: 36-40.
- Paulitz TC, Belanger RR (2001) Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology*: 103-133.
- Shafia A, Sutton JC, Yu H, Fletcher JT (2001) Influence of preinoculation light intensity on development and interactions of *Botrytis cinerea* and *Clonostachys rosea* in tomato leaves. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23: 346-57.
- Shtienberg D, Elad, Y (1997) Incorporation of weather forecasting to integrated, chemical-biological management of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 87: 332-340.
- Shtienberg D, Elad Y, Ariela Niv, Nitzani Y, Kirshner B (1998) Significance of leaf infection by *Botrytis cinerea* in stem rotting of tomatoes grown in non-heated greenhouses. *European Journal of Plant Pathology* 104: 753-763.
- Silvera-Perez AE, Valdebenito-Sanhueza RM, Duarte V, Santos HP, Felippeto J (2010) Control of gray mold with *Clonostachys rosea* in the production of fuchsia cuttings. *Tropical Plant Pathology* 35: 163-169.
- Sutton JC, Li DW, Peng G, Yu H, Zhang P, Valdebenito-Sanhueza RM (1997) *Gliocladium roseum*: A versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Disease* 81: 316-28.

Sutton JC, Liu W, Huang R, Owen-Going N (2002) Ability of *Clonostachys rosea* to establish and suppress sporulation potential of *Botrytis cinerea* in defoliated stems of hydroponic greenhouse tomatoes. *Biocontrol Science and Technology* 12: 413-425.

ten Have A, van Berloo R, Lindhout P, van Kan JAL (2007) Partial stem and leaf resistance against the fungal pathogen *Botrytis cinerea* in wild relatives of tomato. *European Journal of Plant Pathology* 117:153-166.

Yildiz F, Yildiz M, Delen N, Coskuntuna A, Kinay P, Turkusay H (2007) The effects of biological and chemical treatment on gray mold disease in tomatoes grown under greenhouse conditions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 31: 319-325.

Yohalem DS (2004) Evaluation of fungal antagonists for grey mould management in early growth of pot roses. *Annals of Applied Biology* 144: 9-15.

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

Zaldúa S, Sanfuentes E (2010) Control of *Botrytis cinerea* in *Eucalyptus globules* mini-cuttings using *Clonostachys rosea* and *Trichoderma* strains. *Chilean Journal of Agricultural Research* 70: 576-582.

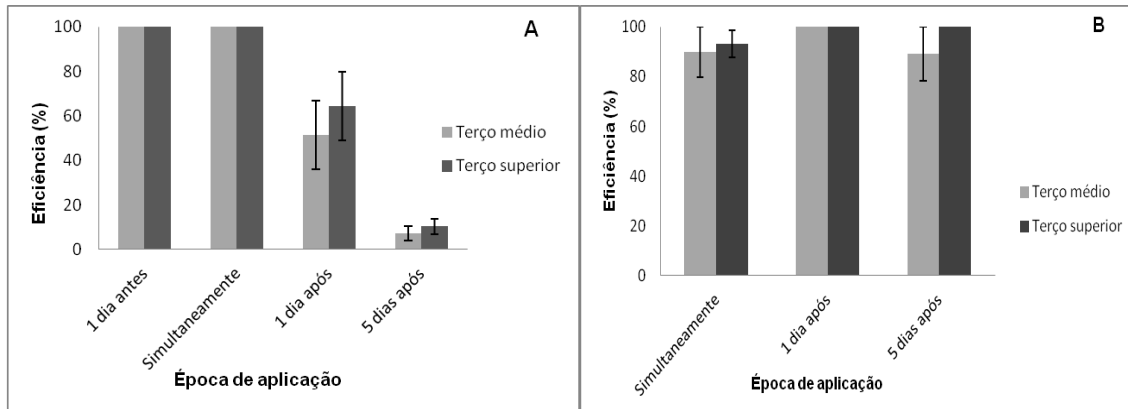


Fig 1. Eficiência de controle do mofo cinzento com aplicação de *Clonostachys rosea* em épocas relacionadas à inoculação de *Botrytis cinerea*. A – Segmentos de hastes; B – Plantas. Médias de dez repetições para hastes e sete para plantas. Barras representam o erro padrão da média.

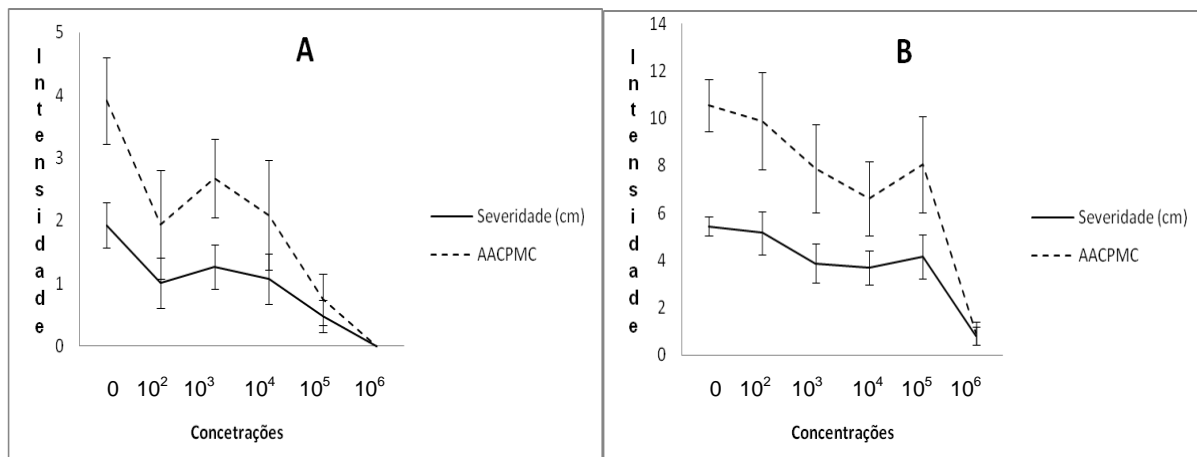


Fig 2. Severidade, dada pelo comprimento de lesão (cm) no oitavo dia após a inoculação de *B. cinerea*, e área abaixo da curva de progresso do mofo cinzento (AACPMC) do tomateiro em função das concentrações  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> de *Clonostachys rosea*. A – Segmentos de hastes; B – Plantas. Médias de nove repetições para haste e oito para plantas. Barras representam o erro padrão da média.

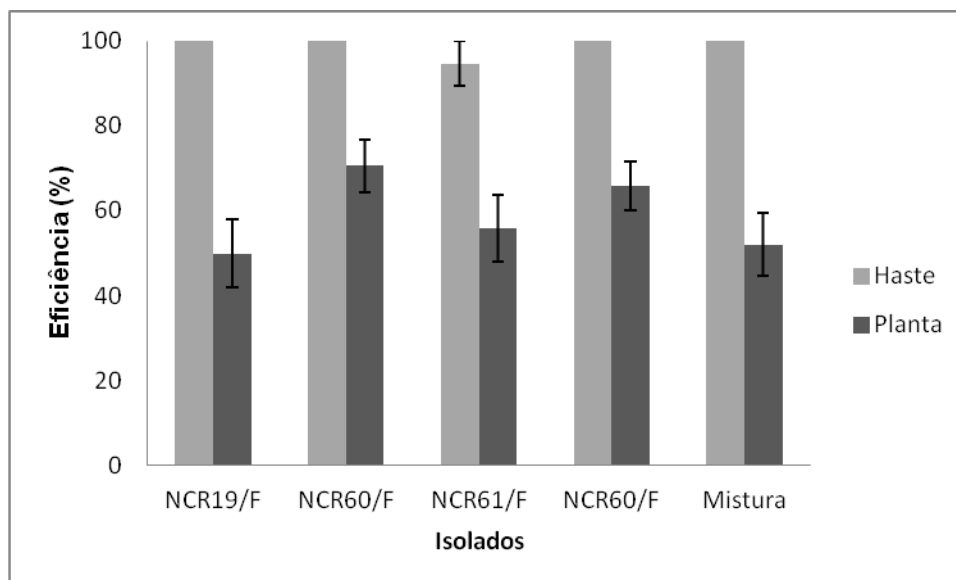


Fig 3. Eficiência de controle do mofo cinzento em segmentos de hastes ou plantas de tomateiro em função de cada isolado de *Clonostachys rosea* ou da mistura destes. Médias de dez repetições. As barras representam o erro padrão da média.

Tabela 1 – Área baixo da curva de progresso do mofo cinzento oito dias após inoculação do isolado ToV<sub>1</sub>b de *Botrytis cinerea* e aplicação dos isolados de *Clonostachys rosea*, NCR19/F, NCR60/F, NCR61/F e NCR62/F. Aplicou-se água destilada e esterilizada (ADE) como controle negativo e inoculação individual do do isolado ToV<sub>1</sub>b como controle positivo.

	ToV <sub>1</sub> b	ADE	NCR19/F	NCR60/F	NCR61/F	NCR62/F	Mistura
Haste	11.51*	0	0	0	0.57	0	0
Planta	10.7	3.72	4.09	4.5	2.87	3.71	2.99

\* Médias de dez repetições.

## CAPÍTULO 3

### Composto(s) produzidos por *Clonostachys rosea* com efeito fungistático sobre *Botrytis cinerea*

#### Resumo

*Clonostachys rosea* é conhecido por controlar *B. cinerea*, agente causal do mofo cinzento, em diferentes culturas. O antagonista atua principalmente por micoparasitismo e competição por espaço e nutrientes. Sabe-se que *C. rosea* produz enzimas e compostos do metabolismo secundário deletérios a outros patógenos, mas este efeito não é bem elucidado para *B. cinerea*. Assim, avaliou-se a produção de composto(s) como mecanismo de antagonismo de *C. rosea* a *B. cinerea*. O antagonista não produziu compostos voláteis que afetaram o patógeno. O(s) composto(s) produzido pelo antagonista em meio de cultura inibiu, *in vitro*, a germinação de conídios e a atividade de escleródios e de discos de micélio. O efeito observado é fungistático, pois estes propágulos retomaram o crescimento depois de repicados para placas de Petri com meio sem o(s) composto(s) do antagonista. Quando aplicado em diferentes épocas em segmentos de hastes de tomateiros, o sobrenadante reduziu o tamanho da lesão do patógeno, e a eficiência de redução foi maior que 90%, quando aplicado um dia antes e no momento da inoculação do patógeno. Em plantas, a aplicação do sobrenadante reduziu em aproximadamente 50% o comprimento de lesão somente quando aplicado um dia antes da inoculação. Segundo os dados obtidos, os isolados de *C. rosea* atuam produzindo composto(s) orgânico(s) deletério(s) a *B. cinerea*. Este(s) composto(s) precisa(m) ser identificado(s), o que poderia possibilitar desenvolver um produto comercial à base do composto.

## 1. Introdução

*Clonostachys rosea* (Link Fries) [forma perfeita = *Bionectria ochroleuca*], anteriormente classificado como *Gliocadium roseum* (Schroers et al., 1999) é um hifomiceto amplamente distribuído no mundo (Domsh et al., 1980). O fungo, por diferentes mecanismos de ação, é conhecido pela sua eficiência em controlar diferentes fitopatógenos (Sutton et al., 2002; Lahoz et al., 2004; Roberti et al., 2008; Rodriguez et al., 2011), entre estes *Botrytis cinerea*, agente causal do mofo cinzento. Para o controle desta doença, *C. rosea* é conhecido por atuar, principalmente, por micoparasitismo e/ou competição por espaço e nutrientes com o patógeno.

Como micoparasita, hifas de *C. rosea* parasitam conídios, escleródios e hifas de *B. cinerea* (Sutton et al., 1997). Por microscopia, visualizaram-se hifas do antagonista estrangulando hifas de *B. cinerea* (Morandi et al., 2001) e também observou-se ruptura e degradação de conídios e tubo germinativo do patógeno (Li et al., 2002). Por competição, o antagonista inibe a esporulação de *B. cinerea* em diferentes hospedeiros, como begônia, tomate, gerânio, framboesa, morango, eucalipto e roseira (Sutton et al., 1997; Nobre et al., 2005). Segundo alguns autores, o sucesso do biocontrole de *B. cinerea* por *C. rosea* nos diferentes hospedeiros deve-se à sua habilidade de se estabelecer e competir com o patógeno na ausência de molhamento foliar, em períodos prolongados de molhamento foliar, independente do estágio de desenvolvimento dos tecidos, além de não ser afetado pela radiação solar e possuir requerimentos de temperaturas próximos aos dos patógenos (Sutton et al., 2002; Morandi et al., 2003; Morandi et al., 2008; Cota et al., 2008).

Atuar por mais de um mecanismo de ação é uma vantagem quando se procura um agente de biocontrole eficiente, pois este pode atuar em diferentes situações. Portanto, é essencial avaliar os possíveis mecanismos de ação do antagonista. Sabe-se que *C. rosea* produz enzimas e

compostos do metabolismo secundário deletérios a outros fitopatógenos (Mamarabadi, et al., 2009; Li et al., 2006; Rodríguez et al., 2011). Identificou-se um gene, *cr-nag1*, no isolado IK726 de *C. rosea* responsável pela produção da enzima N-acetyl- $\beta$ -d-glucosaminidase, que hidrolisa quitina. Observou-se que houve inibição do crescimento micelial de *Fusarium culmorum* e alta expressão do gene durante a interação com *C. rosea* (Mamarabadi, et al., 2009). Purificou-se uma protease extracelular de *C. rosea* que degradou a cutícula do nematóide *Panagrellus redivivus* (Li et al., 2006). Além de enzimas, compostos do metabolismo secundário produzidos por *C. rosea* também possui atividade antagônica. O isolado BAF3874 de *C. rosea* produziu um composto, denominado peptídeo antibiótico, com efeito sobre *Sclerotinia sclerotiorum* (Rodríguez et al., 2011).

No Brasil, os trabalhos com *C. rosea* iniciaram-se na década de 1990 usando o isolado canadense Pg 88-710 (Peng & Sutton, 1991). Na busca por isolados adaptados às condições brasileiras, selecionaram-se quatro isolados de *C. rosea* (NCR19/F, NCR60/F, NCR61/F, NCR62/F), os quais reduziram a esporulação de *B. cinerea* em folhas de morangueiro, roseira, eucalipto e tomateiro (Nobre et al., 2005). Em experimentos de campo, os quatro isolados foram tão eficientes quanto fungicidas no controle de *B. cinerea* em morangueiro (Cota et al., 2008). Sabe-se que, além de atuarem por competição, esses isolados atuam por hiperparasitismo (dados não publicados). Entretanto, não se conhece se estes quatro isolados de *C. rosea* produzem algum composto com ação deletéria a *B. cinerea*. Objetivou-se, assim, avaliar a produção de compostos como mecanismo de *C. rosea* contra o patógeno.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Procedimentos gerais**

Executaram-se os experimentos na Unidade de Controle Biológico (UCB) e casas de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

Do isolado ToV<sub>1b</sub>, de *B. cinerea*, que estava preservado desde 2004 em discos de micélio pelo método Castellani, depositaram-se os discos em meio de batata-dextrose-ágar (BDA) em placas de Petri. Incubou-se a 20°C, fotoperíodo de 12 h e, das bordas da colônia com crescimento ativo, retiraram-se discos de BDA com micélio (1 cm de diâmetro) que foram transferidos para ferimentos, realizados com ponta de estilete, em fragmentos de pecíolo de tomateiro com aproximadamente 5 cm de comprimento. Mantiveram-se os fragmentos inoculados sobre tela de nylon e espuma umedecida, em caixas tipo Gerbox, acondicionadas a 20°C e 12 h de fotoperíodo. Após 5 dias, observou-se esporulação abundante sobre o tecido e, através de isolamento direto, transferiram-se conídios para BDA. Repicou-se para BDA em tubos, que foi mantido a 20°C, 12h de fotoperíodo. Para obtenção de inóculo, após 12 dias, suspenderam-se os conídios em água destilada esterilizada, com auxílio de bastão de vidro, filtrando-os em duas camadas de gaze. Para as inoculações, ajustou-se a suspensão para  $1 \times 10^5$  conídios.mL<sup>-1</sup>, com auxílio de um hemacitômetro.

Usaram-se quatro isolados de *C. rosea* obtidos em condições brasileiras - NCR19/F, NCR60/F, NCR61/F e NCR62/F (Nobre et al., 2005). Estes isolados estão preservados em tubos de ensaio com meio BDA e mantidos a 4°C.

Em casa de vegetação a 25°C semeou-se tomate ‘Santa Clara’ em bandejas de poliestireno expandido (isopor) de 128 células contendo substrato orgânico comercial Tropstrato<sup>®</sup>. Após 25-30 dias, transplantaram-se as mudas para vasos plásticos de 17,5 cm de diâmetro (2L), contendo o mesmo substrato. Irrigou-se diariamente e adubou-se segundo a demanda da cultura.

Usou-se o programa SAS v. 9.1 para as análises estatísticas.

## **2.2. Inibição da germinação de conídios de *B. cinerea* por composto(s) de *Clonostachys rosea***

Executaram-se dois experimentos diferentes, um somente com a mistura dos isolados de *C. rosea* e outro com cada isolado ou a mistura destes. Cultivou-se cada isolado do antagonista em meio BDA a  $25 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12h. Após 10 dias de cultivo, adicionaram-se em um Erlenmeyer com batata-dextrose (BD) um disco de micélio de 1 cm de diâmetro de cada um dos isolados ou quatro discos de um mesmo isolado, permanecendo sob agitação (120 rpm). Após 4 dias, filtrou-se o conteúdo com auxílio de seringa e filtro estéril com membrana *Acrodisc® Syringe Filters*, para a obtenção do sobrenadante.

Posteriormente, misturou-se o sobrenadante à suspensão de conídios de *B. cinerea* a  $2 \times 10^4$  conídios.mL<sup>-1</sup>, na proporção 1:1. Para controle, adicionou-se o meio BD à suspensão de conídios. Depositou-se uma gota de 15 µL em uma lâmina que foi acondicionada em caixa Gerbox sobre tela de nylon e espuma umedecida. Mantiveram-se os Gerbox a 25°C, fotoperíodo de 12 h. Após 12 h, observou-se a germinação dos 100 primeiros conídios visualizados em um microscópio de luz com aumento de 400x. Considerou-se germinado o conídio cujo tubo germinativo tinha pelo menos duas vezes sua largura.

Executou-se cada experimento por duas vezes, em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com onze repetições no primeiro e cinco no segundo (uma unidade experimental = uma lâmina).

Considerando-se que não houve normalidade na primeira execução do experimento, analisaram-se as execuções separadamente. Na primeira execução, fez-se análise descritiva da porcentagem de germinação dos conídios. Na segunda execução, após transformar a

porcentagem de germinação em arcseno  $\sqrt{(\%germinação/100)}$ , fez-se a análise de variância (ANOVA), e compararam-se as médias com o teste de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

### **2.3. Produção de compostos não-voláteis**

Seguindo metodologia de Rodríguez et al. (2011), depositou-se sobre a superfície de meio BDA em placas de Petri um disco de papel celofane esterilizado (90 mm de diâmetro). Posteriormente, aplicou-se 0.2 mL de uma suspensão de conídios de cada isolado de *C. rosea* na concentração  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> e espalhou-se com o auxílio de uma alça de Drigalsky. Mantiveram-se as placas a 25 °C e fotoperíodo de 12h e, após três dias, retirou-se o celofane com colônia do antagonista. Para garantir a inatividade de possíveis propágulos do antagonista, mantiveram-se as placas sob luz ultravioleta (UV) por 50 min, tempo que não afetou o(s) composto(s) no meio. Posteriormente, depositou-se um disco de micélio (9 mm de diâmetro) ou um escleródio de *B. cinerea* no centro da placa (primeira repicagem). Como controle, aplicou-se água destilada estéril sob o celofane. Mantiveram-se as placas a 25 °C e mediu-se o diâmetro das colônias do patógeno diariamente, usando uma régua milimetrada, até que a primeira colônia atingisse a borda da placa. Para avaliar o efeito fungistático ou fungicida, os discos de micélio ou escleródios que permaneceram inativos em BDA com o(s) composto(s) foram repicados para BDA (segunda repicagem) e determinaram-se as percentagens de discos de micélio e de escleródios viáveis.

Executou-se o experimento por duas vezes, em DIC com cinco repetições (uma unidade experimental = uma placa de Petri).

Analisaram-se as execuções dos experimentos em conjunto por análise descritiva. Analisaram-se a taxa de crescimento micelial a partir de discos de micélio ou escleródios e, ainda,

analisou-se a porcentagem de propágulos (micélio e escleródio) que se desenvolveram na primeira e na segunda repicagem.

#### **2.4. Produção de compostos voláteis**

Cultivou-se cada isolado do antagonista, por 10 dias, em meio BDA a 25 °C e fotoperíodo de 12 h. Após 10 dias, adicionou-se em uma placa de Petri com BDA um disco de micélio de cada um dos isolados (1 cm de diâmetro), incubando-a a 25 °C e fotoperíodo de 12h por 24 h. Posteriormente, adicionou-se em outra placa de Petri com BDA um disco de micélio de *B. cinerea* (1 cm de diâmetro). Retiraram-se as tampas das placas de Petri com o patógeno e o antagonista e uniram-nas, selando com plástico PVC. Mantiveram-se as placas a 25°C, fotoperíodo de 12 h e, após 5 dias, avaliou-se o raio das colônias (cm) usando uma régua milimetrada. Como controle, uniram-se as placas com *B. cinerea* a placas de Petri com apenas BDA.

Executou-se o experimento por uma vez, em DIC com cinco repetições (uma unidade experimental = uma placa de Petri). Analisou-se o crescimento radial por ANOVA.

#### **2.5. Aplicação do sobrenadante de *Clonostachys rosea* em segmentos de hastes de tomateiro**

Cultivou-se cada isolado do antagonista em meio BDA a 25 °C e fotoperíodo de 12h. Após 10 dias de cultivo, adicionou-se em um Erlenmeyer com BD um disco de micélio de cada isolado de 1 cm de diâmetro, permanecendo sob agitação (120 rpm) por 4 dias. Para obtenção do sobrenadante, filtrou-se o conteúdo com auxílio de seringa e filtro estéril com membrana *Acrodisc® Syringe Filters*. Para avaliar a estabilidade do(s) possível(is) composto(s) com ação deletéria a *B. cinerea* no sobrenadante, usaram-se dois tipo de sobrenadante: i) logo após a filtração, ii) filtração + autoclavagem por 40 min.

Retiraram-se segmentos de aproximadamente 6 cm no terço médio de hastes de tomateiro com 65 – 70 dias de idade com auxílio de tesoura de poda. Efetuou-se o corte superior do segmento em bisel para facilitar a aplicação do sobrenadante e, posteriormente, a inoculação do patógeno. Usou-se metodologia proposta por O'Neill et al. (1997) com modificações. Acondicionaram-se os segmentos em caixas tipo Gerbox sobre tela de nylon e espuma umedecida, sendo dois segmentos por Gerbox, incubado-os a 25°C, fotoperíodo de 12 h.

No ápice de cada segmento, depositou-se uma gota de 30µL da suspensão de conídios de *B. cinerea* e/ou do sobrenadante de *C. rosea*. Efetuou-se a aplicação do sobrenadante em cinco épocas: 5 dias antes ou após, um dia antes ou após ou simultaneamente da inoculação do patógeno. Aplicou-se BD ou suspensão de conídios do patógeno como controle.

Avaliaram-se, diariamente, até oito dias após a inoculação do patógeno, a severidade da doença pela medição do comprimento da lesão.

Executou-se o experimento por duas vezes em DIC com três repetições (uma unidade experimental = um Gerbox).

Analisaram-se as execuções de cada experimento em conjunto. Transformaram-se os dados de comprimento de lesão para eficiência de *C. rosea* em reduzir a doença (porcentagem de redução do comprimento de lesão em relação à média do tratamento no qual se aplicou somente *B. cinerea*) e avaliou-se por análise descritiva.

## **2.6. Aplicação do sobrenadante de *Clonostachys rosea* em tomateiro**

Obtiveram-se os dois tipos de sobrenadantes, filtrado e filtrado + autoclavado, como no experimento 2.5.

Realizaram-se ferimentos retirando-se um broto no terço superior da planta com auxílio de tesoura de poda, simulando a desbrota. Mantiveram-se as plantas em câmara de crescimento a 18°C, fotoperíodo de 12 h.

Fizeram-se, para cada ferimento, as aplicações dos tratamentos e a avaliação da mesma forma que em 2.5.

Executou-se o experimento por três vezes em DIC, com quatro repetições no primeiro e segundo experimentos e cinco no terceiro (uma unidade experimental = uma planta). Analisou-se semelhante ao experimento 2.5.

### **3. Resultados**

#### **3.1. Inibição da germinação de conídios de *B. cinerea* por composto(s) de *Clonostachys rosea***

No primeiro experimento, com a mistura dos isolados, a germinação de conídios foi de 5.9% com o sobrenadante e 94% sem o sobrenadante. No segundo experimento, os resultados das duas execuções variaram. Na primeira, excetuando-se o isolado NCR19/F, que reduziu a germinação em 42.2%, para os demais tratamentos a redução foi superior a 90% (Fig 1A). Na segunda execução, o sobrenadante do isolado NCR19/F não reduziu significativamente a germinação; os demais, em aplicação individual, reduziram a germinação em aproximadamente 30%, enquanto o renadan da mistura dos isolados reduziu a germinação em 87% (Fig 1B).

#### **3.2. Produção de compostos não-voláteis**

Não se observou atividade de *C. rosea* no meio de cultura. O(s) composto(s) de todos os isolados de *C. rosea* reduziu a taxa de crescimento micelial de *B. cinerea*. Reduziram-se no mínimo 3.5 vezes quando se usaram discos de micélio e 6.25 quando se usaram escleródios, dependendo do isolado de *C. rosea* (Fig 2). Na primeira execução do experimento, somente 30 e

15% do total dos discos de micélio e escleródios, respectivamente, se desenvolveram na primeira repicagem, quando se adicionaram os propágulos em meio BDA com o(s) composto(s). Na segunda repicagem, quando se transferiram os mesmos propágulos para meio BDA sem o(s) composto(s), 90% dos discos de micélio e 85% dos escleródios se desenvolveram. Na segunda, 70% dos discos de micélio e 50% dos escleródios se desenvolveram na primeira repicagem. Na segunda repicagem, 100% dos discos de micélio e escleródios se desenvolveram. Independente se discos de micélio ou escleródios, 100% dos propágulos da testemunha se desenvolveram na primeira e na segunda repicagem.

### **3.3. Produção de compostos voláteis**

Não se observou diferença estatística quanto ao crescimento radial das colônias de *B. cinerea*, após união de placas de Petri com o patógeno e placas de Petri com *C. rosea* (ambos os fungos crescendo em meio BDA), quando comparado à testemunha (placas de Petri com o patógeno crescendo em BDA unidas a placas de Petri com meio BDA somente) ( $p = 0.2929$ ).

### **3.4. Aplicação do sobrenadante de *Clonostachys rosea* em segmentos de hastes de tomateiro**

Com o renadan de *C. rosea*, autoclavado ou não, houve redução do comprimento das lesões causadas por *B. cinerea* em todas as épocas de aplicação em hastes, variando de 97 a 31 % de eficiência dependendo da época. A eficiência foi maior com aplicação do sobrenadante um dia antes ou no momento da inoculação do patógeno (Fig 3).

### **3.5. Aplicação do sobrenadante de *Clonostachys rosea* em tomateiro**

Com o sobrenadante de *C. rosea*, autoclavado ou não, houve redução do comprimento das lesões causadas por *B. cinerea* somente quando aplicado um dia antes da inoculação do patógeno. A eficiência foi de 55% com o sobrenadante não autoclavado e 38% autoclavado. Nas

demais épocas, a eficiência em reduzir o comprimento de lesão foi sempre inferior a 9%, e com alta variabilidade (Fig 4).

#### 4. Discussão

Diferentes mecanismos de antagonismo são atribuídos à eficiência de *C. rosea* em controlar fungos fitopatogênicos, incluindo *B. cinerea*: competição, micoparasitismo e indução de resistência (Sutton et al., 2002; Nobre et al., 2005; Roberti et al., 2008). Sabe-se que o fungo produz enzimas (Li et al., 2006; Mamarabadi, et al., 2009) e compostos do metabolismo secundário, peptídeos antibióticos, com ação antifúngica (Pachanari & Dix, 1980; Rodrigues et al., 2011). Nesse trabalho, buscou-se avaliar, *in vitro* e *in vivo*, se o antagonista produz algum composto contra *B. cinerea*.

Observou-se que a mistura de conídios do patógeno com o sobrenadante em que se cresceu o antagonista resultou em redução da porcentagem de germinação. Resultado semelhante foi observado quando se cultivou *C. rosea* em extrato de malte 2% e, após filtragem, adicionou-se conídios de *B. allii*. Observou-se redução de mais de 90% na germinação dos conídios (Pachenari & Dix, 1980). Também se observou atividade do extrato de malte, cultivado com *C. rosea*, na formação de apressórios de *Magnaporthe grisea*, mas sem afetar a germinação dos conídios (Thines et al., 1998). Portanto, conclui-se que *C. rosea* produz substância(s) antifúngica(s). No presente estudo, observou-se variabilidade na produção de composto(s) pelos isolados de *C. rosea* entre as duas execuções do experimento. Vale ressaltar que se adotou um número de dias de cultivo do antagonista, e não se quantificou o(s) composto(s). Ainda não se definiram as melhores condições para o fungo produzir o(s) composto(s), porém, notou-se diferença de coloração da colônia e do meio de cultivo, dependendo da temperatura, luminosidade e do meio de cultura em si. Segundo Rodríguez et al. (2011), a formação de halo

de inibição, variável usada para avaliar a antibiose de *C. rosea* a *Sclerotinia sclerotiorum*, dependeu do meio de cultura. Além disso, genes que estão relacionados a alguns compostos produzidos por fungos podem não ser expressos em condições laboratoriais (Brakhage & Schroeckh, 2011), possivelmente porque só se produzem estes compostos do metabolismo secundário quando o fungo necessita de se comunicar ou defender de outros organismos (Chiang et al., 2011; O'Brien & Wright, 2011).

Além de reduzir a germinação de conídios, o(s) composto(s) produzido por *C. rosea* em meio BDA reduziu a atividade, cessando o crescimento micelial, ou desenvolvimento, reduzindo a taxa de crescimento micelial, de escleródios e discos de micélio do patógeno. Em meio de cultura com o(s) composto(s) em que se observou desenvolvimento dos propágulos, o crescimento micelial foi ralo (dados não mostrados), diferente do micélio cotonoso na testemunha. Ao se transferir os propágulos inativos para meio de cultura sem o(s) composto(s), observou-se que mais de 90% destes retomaram o desenvolvimento, podendo se afirmar que o(s) composto(s) tem efeito fungistático sobre *B. cinerea*. É importante relatar que os peptídeos antibióticos, compostos do metabolismo secundário produzidos por *C. rosea* (Rodríguez et al., 2011), são principalmente produzidos por espécies de *Trichoderma* (Vey et al., 2001; Mukherjee et al., 2011), gênero de fungo relacionado taxonomicamente a *C. rosea*. Estes peptídeos causam paralisia do crescimento micelial, além de lise nas células das hifas (Daniel & Rodrigues Filho, 2007; Viterbo et al., 2007). Também se observou o efeito sobre o desenvolvimento micelial em *S. sclerotiorum*, e após transferir o fungo de um meio com o(s) composto(s) de *C. rosea* para um meio sem o(s) compostos, somente 50% dos discos de micélio inativos retomaram desenvolvimento (Rodríguez et al., 2011). Por outro lado, apesar de ter sido observado efeito na formação de apressório, nenhum efeito do(s) compostos foi observado na germinação e no

crescimento micelial de *M. grisea* (Thines et al., 1998). Portanto, *C. rosea* produz substância(s), com efeito similar a uma substância antifúngica produzida por *Trichoderma*, que além de inibir a germinação, pode paralisar o crescimento de hifas, efeito fungistático, ou como relatado por outros autores, pode afetar o desenvolvimento de estruturas fúngicas, como apressórios (Thines et al., 1998).

Além do(s) compostos produzido por *C. rosea* em meio de cultura, composto não-volátil, avaliou-se também a produção de compostos voláteis que pudessem afetar *B. cinerea*. Entretanto, não se observou efeito sobre o crescimento micelial e aspecto da colônia do patógeno. Os resultados corroboram os dados de Rodríguez et al. (2011) que relataram que *C. rosea* produz compostos não-voláteis, porém, não produzem compostos voláteis como mecanismo de antagonismo a *S. sclerotiorum*. Assim, conclui-se que *C. rosea* não é eficiente em produzir compostos voláteis com efeito sobre *B. cinerea*.

Avaliou-se, também, a eficiência do sobrenadante de *C. rosea*, produzido em meio de cultura, em segmentos de hastes e em tomateiros. Em segmentos de haste, o sobrenadante reduziu a severidade do mofo cinzento em todas as épocas de aplicação avaliadas, com maior eficiência quando aplicado um dia antes ou simultaneamente da inoculação do patógeno. A eficiência da aplicação um dia após da inoculação do patógeno reduziu-se no mínimo em 40%, provavelmente porque *B. cinerea* já havia iniciado a infecção e parte de seu micélio não entrou em contato com o sobrenadante. Em plantas, a eficiência ocorreu apenas quando o sobrenadante foi aplicado um dia antes, mesmo assim, inferior ao observado em haste. Apesar da eficiência, é possível que este composto seja instável no ambiente. Como verificamos que o sobrenadante autoclavado e o não autoclavado não diferiram em eficiência, é provável que a temperatura não afeta a estabilidade do composto. Há evidências da instabilidade dos compostos produzidos por

*C. rosea* contra fitopatógenos (Pachenari & Dix 1997). Os autores observaram que 60-92% dos conídios de *B. allii* germinaram após 72h em contato com o(s) composto(s) produzido por *C. rosea*, enquanto somente 0-33% germinaram nas primeiras 48h. Sendo fungistático, o composto pode atuar dando uma vantagem competitiva a *C. rosea*, perdendo o efeito após o fungo colonizar o substrato. Como relatado acima, *C. rosea* parece produzir substância(s) antifúngica(s) de ação não específica, atuando sobre diferentes espécies e diferentes estruturas fúngicas. Como fungo saprófita, a produção desse(s) tipo(s) substância(s) proporcionaria que *C. rosea* colonizasse o substrato mais rápida e eficientemente, sem necessariamente matar as demais espécies.

Como mencionado acima, não se identificou e nem se quantificou o(s) composto(s). Estudos para sua identificação e quantificação auxiliarão a definir se o(s) composto(s) pode ser usado como um produto comercial. Os quatro isolados de *C. rosea* usados nesse estudo mostraram-se eficientes em suprimir *B. cinerea*, em laboratório e campo, tanto quanto fungicidas (Nobre et al., 2005; Cota et al., 2008). Sabe-se que estes isolados atuam por competição e hiperparasitismo, e atuando por mais de um mecanismos de ação aumenta seu potencial como agente de biocontrole. Nessa perspectiva, tentou-se, recentemente, formular um produto à base desses isolados. Desconhecia-se que estes produziam composto(s) com ação contra *B. cinerea*, o que aumenta o potencial de uso dos isolados aplicados individualmente ou em mistura ou da extração do(s) composto(s) antifúngico(s). Caso se consiga isolar o(s) composto(s), o efeito reduzido em planta e a instabilidade ao longo do tempo poderão ser compensados por uma dose maior do(s) composto(s). Este é o primeiro relato de que *C. rosea* produz um composto com ação fungistática a *B. cinerea*, inclusive quando esse é aplicado em planta.

## Referências

- Brakhage AA, Schroeckh V (2011) Fungal secondary metabolites – strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genetics and Biology* 48:15-22.
- Chiang YM, Chang SL, Oakley BR, Wang CC (2011) Recent advances in awakening silent biosynthetic gene cluster and linking orphan clusters to natural products in microorganisms. *Current Opinion in Chemical Biology* 15:137-143.
- Cota LV, Maffia LA, Mizubuti ESG, Macedo PEF, Antunes RF (2008) Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. *Biological Control* 46: 515-522.
- Daniel JF, Rodrigues Filho E (2007) Peptaibols of *Trichoderma*. *Natural Product Reports* 24: 1128-1141.
- Domsch KH, Gams W, Anderson TH (1980) *Compendium of soil fungi*. Vol 1. London: UK, Academic Press.
- Lahoz E, Contillo R, Porrone F (2004) Induction of systemic resistance to *Erysiphe orontii* cast in tobacco by application on roots of an isolate of *Gliocladium roseum* Bainier. *Journal of Phytopathology* 152: 465-470.
- Li GQ, Huang HC, Kokko EG, Acharya SN (2002) Ultrastructural study of mycoparasitism of *Gliocladium roseum* on *Botrytis cinerea*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 43: 211-218.
- Li J, Yang JK, Huang XW, Zhang KQ (2006) Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor. *Process Biochemistry* 41: 925-929.
- Mamarabadi M, Jensen DF, Lubeck M (2009) An N-acetyl-b-D-glucosaminidase gene, cr-nag1, from the biocontrol agent *Clonostachys rosea* is up-regulated in antagonistic interactions with *Fusarium culmorum*. *Mycological Research* 113: 33-43.
- Morandi MAB, Maffia LA, Mizubuti ESG, Alfenas AC, Barbosa JG (2003) Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: a valuable component in Botrytis blight management in commercial greenhouses. *Biological Control* 26: 311–317.
- Morandi M A B, Maffia L A, Sutton J C (2001) Development of *Clonostachys rosea* and interactions with *Botrytis cinerea* in rose leaves and residues. *Phytoparasitica* 29: 1-11.
- Morandi MAB, Mattos LPV, Santos ER, Bonugli RC (2008) Influence of application time on the establishment, survival, and ability of *Clonostachys rosea* to suppress *Botrytis cinerea* sporulation on rose debris. *Crop Protection* 27: 77-83.

- Mukherjee PK, Horwitz BA, Kenerley CM (2011) Secondary metabolism in *Trichoderma* - a genomic perspective. *Microbiology-SGM* 158: 35-45.
- Nobre SAM, Maffia LA, Mizubuti ESG, Cota LV, Dias APS (2005) Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. *Biological Control* 34: 132-143.
- O'Brien J, Wright GD (2011) An ecological perspective of microbial secondary metabolism. *Current Opinion in Biotechnology* 22:552-558.
- O'Neill TM, Shtienberg D, Elad, Y (1997) Effect of some host and microclimate factors on infection of tomato stems by *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 81: 36-40.
- Pachenari A, Dix NJ (1980) Production of toxins and wall degrading enzymes by *Gliocladium roseum*. *Transactions of the British Mycological Society* 74: 561-566.
- Peng G, Sutton JC (1991) Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. *Canadian Journal of Plant Pathology* 13, 247-257.
- Roberti R, Veronesi A, Cesari A, Cascone A, Di Berardino I, Bertini L, Caruso C (2008) Induction of PR proteins and resistance by the biocontrol agent *Clonostachys rosea* in wheat plants infected with *Fusarium culmorum*. *Plant Science* 175: 339-347.
- Rodriguez MA, Cabrera G, Gozzo FC, Eberlin MN, Godeas A (2011) *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent . *Journal of Applied Microbiology* 110: 1177-1186.
- Schroers HJ, Samuels GJ, Seifert KA, Gams W (1999) Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. *Mycologia* 91: 365-385.
- Sutton JC, Li DW, Peng G, Yu H, Zhang P, Valdebenito-Sanhuenza RM (1997) *Gliocladium roseum*: A versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Disease* 81: 316-28.
- Sutton JC, Liu W, Huang R, Owen-Going N (2002) Ability of *Clonostachys rosea* to establish and suppress sporulation potential of *Botrytis cinerea* in deleafed stems of hydroponic greenhouse tomatoes. *Biocontrol Science and Technology* 12: 413-425.
- Thines E, Eilbert F, Anke H, Sterner O (1998) Glisoprenis C, D and E, new inhibitors of appressorium formation in *Magnaporthe grisea*, from cultures of *Gliocladium roseum*. 1 Production and biological activities. *Journal of Antibiotics* 51:117-22.
- Vey A, Hoag IRE, But TM (2001) Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: But TM, Jackson C, Magan N (Eds) *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. USA, CaB International Publishing. Pp. 311.

Viterbo A, Wiest A, Brotman Y, Chet I, Kenerley C (2007) The 18mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defence responses. *Molecular Plant Pathology* 8: 737-746.

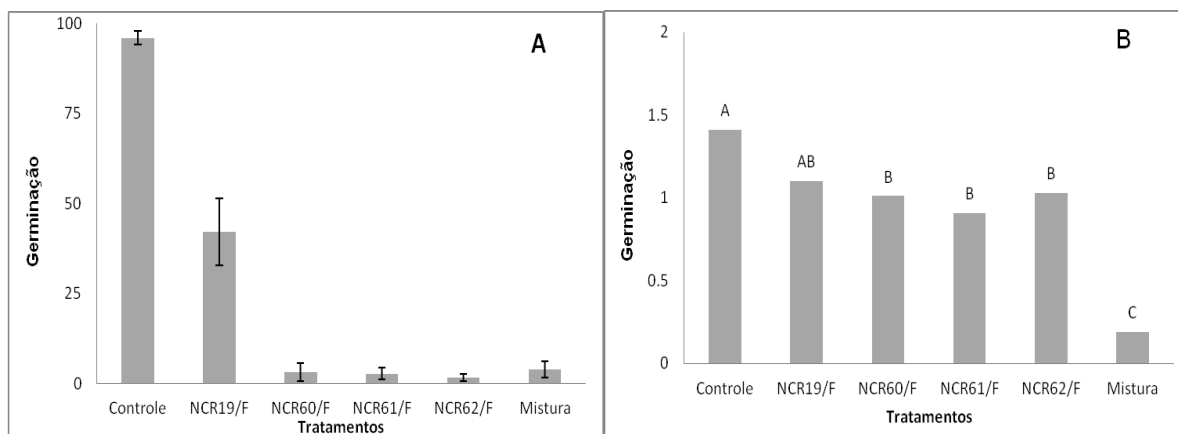


Fig 1. Germinação de conídios de *Botrytis cinerea* com aplicação do sobrenadante dos isolados de *Clonostachys rosea* (Cr 19, Cr 60, Cr61, Cr62) individualmente ou em mistura. A – primeira execução, dados em porcentagem de germinação. B – Segunda execução, dados de porcentagem de germinação transformados para arcseno  $\sqrt{(\%germinação/100)}$ . Médias de 10 repetições. As médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ). Barras representam o erro padrão da média.

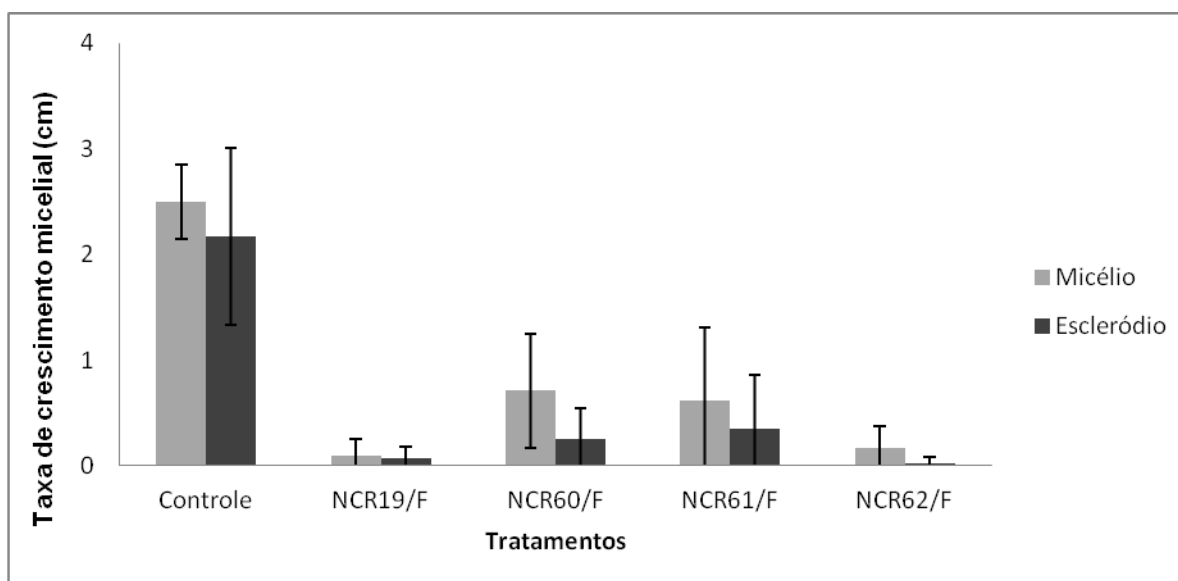


Fig 2. Taxa crescimento micelial de *Botrytis cinerea*, tamanho da colônia dividido pelo número de dias de avaliação, usando discos de micélio ou escleródios como propágulos, crescidos em BDA com o(s) composto(s) dos isolados de *Clonostachys rosea*. Médias de 10 repetições. Barras representam o erro padrão da média.

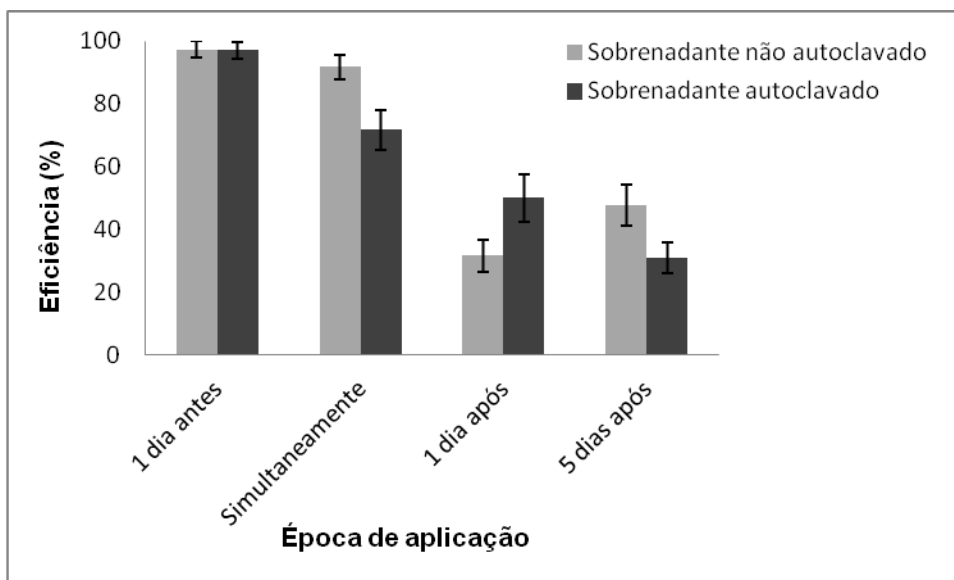


Fig 3. Eficiência de controle do mofo cinzento em hastes de tomateiros com aplicação do sobrenadante de *Clonostachys rosea*, autoclavado ou não, em quatro épocas, relacionadas à inoculação de *Botrytis cinerea*. Médias de 12 hastes. Barras representam o erro padrão da média.

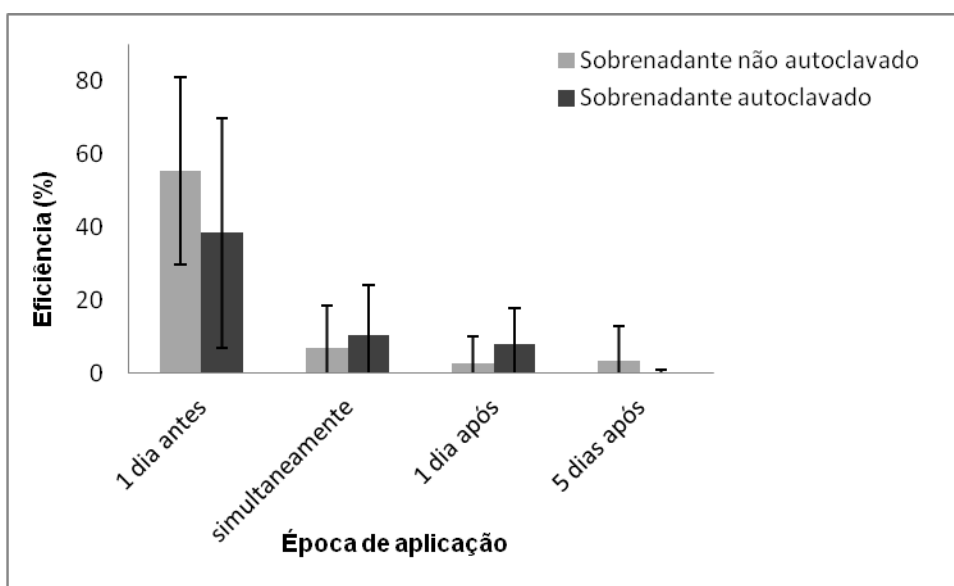


Fig 4. Eficiência de controle do mofo cinzento em tomateiros com aplicação do sobrenadante de *Clonostachys rosea*, autoclavado ou não, em quatro épocas, relacionadas à inoculação de *Botrytis cinerea*. Médias de 13 repetições. Barras representam o erro padrão da média.

## Capítulo 4

### ***Clonostachys rosea* promove o crescimento e biocontrola o mofo cinzento em tomates**

#### **Resumo**

*Clonostachys rosea* biocontrola patógenos em diferentes culturas, inclusive *Botrytis cinerea* em tomateiro. A aplicação do antagonista em sementes, mudas ou substratos é vantajosa, pois pode favorecer o controle de patógenos direta ou indiretamente e promover o crescimento de plantas sem demandar aplicações repetidas. Avaliou-se a aplicação de *C. rosea* no local e distante do local de inoculação de *B. cinerea* e se comparou seu efeito a acibenzolar-S-metil (ASM) (produto comercial Bion®, Syngenta), reconhecidamente indutor de resistência em tomateiro a outros patógenos. Avaliou-se, ainda, se o antagonista promove crescimento em mudas do tomateiro e o(s) mecanismo(s) envolvido(s) na promoção. O ASM não afetou diretamente a germinação de *B. cinerea*. Adicionalmente, ASM e *C. rosea* não controlaram o mofo cinzento, quando aplicados na parte aérea ou nas raízes de tomates. ASM também foi ineficiente quando aplicado no local de inoculação do patógeno. *Clonostachys rosea* foi eficiente principalmente quando aplicado no momento da remoção das hastes do tomateiro e da inoculação do patógeno. O antagonista também promoveu o crescimento de tomates em substrato autoclavado ou não, proporcionando aumento dos pesos radicular e da parte aérea. Dos mecanismos avaliados, não houve diferença no conteúdo de nutrientes em plantas em que se aplicou *C. rosea*, o fungo não produziu ácido indol acético (AIA) e sideróforo, porém solubilizou fosfato de diferentes fontes. Além disso, *C. rosea* colonizou os tecidos do tomateiro por 35 dias, tempo de duração dos experimentos, principalmente nas raízes e parte na inferior de hastes. Demanda-se avaliar mais profundamente a promoção de crescimento do tomateiro por *C. rosea*.

## 1. Introdução

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é a hortaliça mais cultivada no Brasil, que é o oitavo maior produtor mundial (FAOSTAT, 2010). Uma das alternativas de cultivo do tomateiro é o plantio em ambiente protegido. Essa modalidade de cultivo vem crescendo no país e um dos motivos é a maior produtividade que no cultivo em céu aberto (Calvete et al., 1992). Entretanto, nessas condições ocorrem diversos patógenos, como *Botrytis cinerea* Pers.: Fr., agente causal do mofo cinzento. O ambiente proporcionado pelo cultivo protegido, com temperatura constante e umidade alta por longos períodos, favorece a doença (Elad, 1996). Apesar de o patógeno infectar flores, frutos e folhas (Shtienberg et al., 1998), o principal problema do mofo cinzento em tomateiro é a infecção da haste a partir de ferimentos gerados pela remoção de brotos laterais durante os tratos culturais (Elad, 1996), que causa a morte prematura das plantas (Shtienberg et al., 1998). Controla-se a da doença principalmente por fungicidas. Entretanto, além dos problemas ambientais causados pelo uso intensivo de fungicidas, ocorre seleção de isolados do patógeno resistentes a fungicidas (Zhao et al., 2010; Veloukas et al., 2011), o que dificulta o controle químico do mofo cinzento. Portanto, demandam-se métodos alternativos para supressão de *B. cinerea* em plantios comerciais. Nesse contexto, o uso de agentes de controle biológico pode ser alternativa eficiente.

Dentre os micro-organismos com potencial de uso na agricultura, tem-se enfatizado *Clonostachys rosea* (Link Fries), fungo que ocorre naturalmente no solo, restos culturais, plantas daninhas e cultivadas e está amplamente distribuído no mundo (Sutton et al., 1997). O fungo é antagonista a diversos patógenos (Sutton et al., 1997; Morandi et al., 2003; Baloyi et al., 2011; Chatterton et al., 2012), pode induzir resistência (Lahoz et al., 2004; Roberti et al., 2008) e promover o crescimento de plantas (Sutton et al., 2008; Bennett et al., 2009), inclusive de

tomateiros (Ravnskov et al., 2006). O uso de *C. rosea* em ambiente protegido suprimiu a esporulação de *B. cinerea* nos restos culturais de roseira, mesmo em condições favoráveis ao patógeno (Morandi et al., 2003). Em cultivo hidropônico, o antagonista também suprimiu o patógeno em ferimentos de haste do tomateiro (Sutton et al., 2002; Kapongo et al., 2008).

No Brasil, selecionaram-se quatro isolados de *C. rosea* (NCR19/F, NCR60/F, NCR61/F, NCR62/F), inicialmente visando o controle biológico direto de *B. cinerea* (Nobre et al., 2005). Estes isolados foram eficientes em condições de laboratório e de campo (Nobre et al., 2005; Cota et al., 2008). Posteriormente, observou-se que os isolados têm potencial em promover o crescimento de plantas de diversas espécies (Macedo, 2011) e induzir resistência ao pepineiro a *B. cinerea* (Silva, 2012). Além disso, o antagonista suprimiu eficientemente o mofo cinzento em hastes de tomateiro (capítulo 2).

Agentes de biocontrole podem ser aplicados em sementes ou mudas, o que é vantajoso, pois os micro-organismos podem sobreviver e proliferar durante a estação de cultivo, podendo atuar no controle de patógenos direta ou indiretamente e, em alguns casos, promover o crescimento de plantas sem demandar aplicações repetidas (Shoresh et al., 2010). Assim, avaliou-se se os isolados de *C. rosea* selecionados nas condições brasileiras podem controlar *B. cinerea* em tomateiro quando aplicados no local e distante do local de inoculação do patógeno. Objetivou-se, também, estudar se a aplicação destes isolados em semente/substrato pode resultar em promoção de crescimento de mudas de tomateiro e avaliar os potenciais mecanismos associados à promoção do crescimento de tomateiros.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Procedimentos gerais**

Realizaram-se os experimentos na Unidade de Controle Biológico e em casas de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. Nessas condições, avaliaram-se os quatro isolados de *C. rosea*, obtidos em condições brasileiras NCR19/F, NCR60/F, NCR61/F e NCR62/F (Nobre et al., 2005), aqui denominados de Cr19, Cr60, Cr61 e Cr62, respectivamente.

Após 10 dias de cultivo em tubos de ensaio com meio batata-dextrose-ágar (BDA) a  $25 \pm 2$  °C, sob luz branca fluorescente, fotoperíodo de 12 h, com bastão de vidro, retiraram-se os conídios, os quais foram suspensos em água destilada esterilizada (ADE) e filtrados em duas camadas de gaze. Com um hemacitômetro, ajustou-se a concentração da suspensão de cada isolado para  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>. Para se obter a mistura dos isolados na concentração de  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>, misturaram-se volumes iguais da suspensão de cada isolado.

Usaram-se sementes ou plantas de tomate com 65 dias após o semeio (variedade Santa Clara), selecionado preliminarmente quanto ao potencial de promoção de crescimento após aplicação de *C. rosea*. Usou-se o isolado ToV<sub>1</sub>b de *B. cinerea*, obtido de tomateiro, para avaliar a indução de resistência.

### **2.2. Biocontrole do mofo cinzento com aplicação de *Clonostachys rosea* na raiz, parte aérea ou no local de inoculação de *Botrytis cinerea***

Transplantaram-se mudas de tomate de 30 dias para vasos de 2L com o substrato Topstrato<sup>®</sup>, em casa de vegetação. Irrigaram-se as plantas diariamente e adubou-se de acordo com a demanda, com o fertilizante Nutriverde<sup>®</sup> (13-13-13), 10 g/L, 20 ml por planta. Compararam-se três tratamentos: acibenzolar-S-metil (ASM) 5g/100 L, a mistura dos quatro isolados de *C.*

*rosea* e ADE. Aplicaram-se os tratamentos em cinco épocas: 6, 4, 2, 1 dia antes e no momento de se inocular o patógeno. Considerando-se os três tratamentos e as cinco épocas, executaram-se três experimentos quanto à aplicação dos tratamentos: E1. na raiz, E2. na parte aérea, distante do local de inoculação de *B. cinerea* e E3. no local de inoculação do patógeno. Em E1, aplicaram-se 50 ml de cada tratamento no solo. Em E2, com um atomizador De Vilbiss, aplicou-se cada tratamento na parte aérea das plantas, cobrindo o local de inoculação de *B. cinerea*. Em E3, com um atomizador tipo De Vilbiss, aplicou-se cada tratamento na haste inoculada, antes da desbrota, exceto quando se aplicaram os tratamentos no momento da inoculação de *B. cinerea*, para os quais desbrotaram-se os tomateiros antes da aplicação. Preparou-se a suspensão de *C. rosea* raspando-se colônias crescidas em BDA em placas, retirando-se os conídios com ADE e ajustando-se a concentração para  $2 \times 10^6$  conídios/ml, com auxílio de um hemacitômetro. Preparou-se o inóculo de *B. cinerea* raspando-se conídios em BDA em placas, retirando-se os conídios com ADE e se ajustando a concentração para  $1 \times 10^5$  conídios/ml, com auxílio de um hemacitômetro. Inoculou-se o patógeno imediatamente após a desbrota (35 dias após transplante), na região mediana das plantas, aplicando-se uma gota de 30  $\mu$ L da suspensão de conídios nos ferimentos em plantas. Mantiveram-se as plantas em câmara de crescimento (UR > 95%, 22 °C, fotoperíodo de 12 h) e avaliou-se diariamente o comprimento da lesão.

Tentou-se isolar de *C. rosea* das plantas tratadas. Para tanto, cortaram-se folhas, hastes e raízes em fragmentos de 1 cm, os quais foram passados, sucessivamente, os fragmentos em etanol a 70% por 30 s, hipoclorito de sódio a 1% por 1 min e em ADE. Após secos na câmara de fluxo laminar, transferiram-se os fragmentos dos três órgãos para o meio seletivo de *C. rosea* (Park *et al.*, 1992), incubando-se a 25 °C, fotoperíodo de 12 h. Avaliou-se a presença ou não de *C. rosea* nos fragmentos após 12 dias, sob o microscópio estereoscópico.

Executaram-se os experimentos por duas vezes em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial (3 tratamentos x 5 épocas de aplicação) com quatro repetições (uma planta = uma unidade experimental). Estimaram-se, para a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e a taxa de expansão da lesão, e se efetuaram análise de variância e testes de média, quando necessário, com o Programa SAS v 9.2.

### **2.3. Promoção de crescimento de tomateiros por *Clonostachys rosea***

Semearam-se duas sementes por copo plástico de 0,5 L com o substrato orgânico Topstrato<sup>®</sup>, autoclavado ou não. Após o plantio, os copos permaneceram em casa de vegetação com temperatura média de 25 °C. Compararam-se seis tratamentos: água (testemunha), suspensão de  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup> de cada isolado de *C. rosea* e mistura dos quatro, com concentração de  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>. Imergiram-se as sementes nos tratamentos por 1 h antes da semeadura. Imediatamente após a semeadura, regou-se cada copo com 20 mL do respectivo tratamento. Após a semeadura, diariamente avaliou-se a emergência das plântulas e desbastou-se, deixando-se uma plântula por copo plástico. Após 35 dias do plantio, determinaram-se a altura, o número de folhas, os nutrientes da parte aérea, peso fresco da raiz (PFR), peso fresco da parte aérea (PFPA), peso seco da raiz (PSR) e peso seco da parte aérea (PSPA). Para determinar o peso seco, os órgãos foram cortados, colocados em sacos de papel e secos em estufa a 60°C por 48 h. No início e 15 dias após do semeio, analisou-se quimicamente o substrato, autoclavado ou não, inclusive quanto ao teor de amônia. Ao final do experimento, após 35 dias, avaliou-se a colonização por *C. rosea* nos tecidos do tomateiro. Cortaram-se fragmentos de 1 cm de comprimento de raízes, das partes inferior, mediana e superior das hastes e discos de 1 cm de diâmetro de folhas retiradas nas partes inferior, mediana e superior das hastes. Transferiram-se os fragmentos/discos para meio seletivo para *C. rosea* (Park et al., 1992) em placas de Petri,

incubando-se a 25 °C, fotoperíodo 12 h. Avaliou-se a presença de *C. rosea* nos fragmentos após 12 dias, sob o microscópio estereoscópico, confirmando-se sob microscópio de luz. Calculou-se a frequência da presença do fungo.

Executou-se o experimento por duas vezes em esquema fatorial (6 tratamentos x 2 substratos) com 20 repetições para altura e número de folhas, cinco para PSR, PSPA, PFR e PFPA e três repetições para nutrientes da parte aérea (um copo ou um planta = uma unidade experimental). Realizaram-se, para PSR, PSPA, PFR e PFPA, análise de variância e testes de média, com o Programa SAS v 9.2. Efetuou-se análise descritiva para altura, número de folhas nutrientes da parte aérea e do solo.

#### **2.4. Produção de ácido-indol-3-acético (AIA) por isolados de *Clonostachys rosea***

Avaliou-se a capacidade de *C. rosea* em sintetizar AIA: colocaram-se três discos de BDA de 1 cm de diâmetro com cultura micelial de cada isolado de *C. rosea* em frascos Erlenmeyers com 50 ml de meio tripticaseína de soja diluído dez vezes e mais 5 mM de triptofano. Usaram-se frascos sem *C. rosea* como controle. Mantiveram-se os frascos em mesa agitadora a 150 rpm a 25°C, fotoperíodo de 12 h. Após uma semana, filtrou-se, coletou-se o sobrenadante, que foi centrifugado a 5000 rpm por 5 min.

Quantificou-se o AIA pelo método do reagente Salkowski (Bric et al., 1991), com modificações. Transferiram-se 150 µl do sobrenadante, após centrifugação, e 100 µl do reagente de Salkowski (FeCl<sub>3</sub> 0,5M) para placas de cultivo celular com 96 poços, que foram mantidas no escuro. Após 30 min, registrou-se a absorbância a 530 nm e estimaram-se os valores de AIA a partir da curva padrão com AIA (Sigma), variando de 1 a 50 µg ml<sup>-1</sup>.

Executou-se o experimento por duas vezes em DIC com seis repetições (uma unidade experimental = um poço). Realizou-se, para os valores observados, análise de variância com o Programa SAS v 9.2.

## **2.5. Produção de sideróforos do tipo hidroxamato por isolados de *Clonostachys rosea***

Avaliou-se a capacidade de *C. rosea* em sintetizar sideróforos: colocaram-se três discos de BDA de 1 cm de diâmetro com cultura micelial de cada isolado de *C. rosea* em frascos Erlenmeyers com 50 ml de meio tripticaseína de soja diluído dez vezes, condição de deficiência de ferro. Usaram-se frascos sem *C. rosea* como controle. Mantiveram-se os frascos em mesa agitadora a 150 rpm a 25°C, fotoperíodo de 12 h. Após uma semana filtrou-se, coletou-se o sobrenadante, que foi centrifugado a 5000 rpm por 5 min.

Quantificou-se a produção de sideróforos do tipo hidroxamato pelo método de tetrazólio (Snow, 1954), com modificações. Em tubos de microcentrífuga misturaram-se 1 ml do sobrenadante, após centrifugação, a 1 ml de NaOH 2 M e 200 mg de vermelho de tetrazólio. Transferiu-se o material para placas de cultivo celular com 96 poços, e registrou-se a absorbância a 425 nm. Estimaram-se os valores de sideróforos a partir de uma curva padrão de cloridrato de hidroxilamina variando de 0 a 500 mg l<sup>-1</sup>.

Executou-se o experimento uma vez em DIC com seis repetições (uma unidade experimental = um poço). Realizou-se, para os valores observados, análise de variância com o Programa SAS v 9.2.

## **2.6. Solubilização de fontes inorgânicas de fosfato por isolados de *Clonostachys rosea***

Realizaram-se dois experimentos. No primeiro, testou-se a capacidade de *C. rosea* em solubilizar fosfato de cálcio em meio sintético. Repicou-se cada isolados para 20 ml de meio NBRIP (Nautiyal, 1999), acrescido de fosfato tricálcico, em placa de Petri. Obteve-se um meio

de cultura com a concentração de  $100 \text{ mg l}^{-1}$  de fósforo. Mantiveram-se as placas a  $25^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 12 h. Após uma semana, determinou-se a capacidade de cada isolado em solubilizar fosfato de cálcio, pela visualização de um halo transparente ao redor da colônia. Executou-se o experimento por duas vezes em DIC com seis repetições (uma unidade experimental = uma placa de Petri).

No segundo experimento, quantificou-se fósforo solúvel em meios com diferentes fontes de fosfatos. Colocaram-se três discos de cada isolado em frascos Erlenmeyers com 50 ml de meio NBRIP líquido acrescido de cinco fontes de fosfatos (fosfato de cálcio, fosfato de alumínio, fosfato de ferro, rocha de Araxá (32% de  $\text{P}_2\text{O}_5$ ) e rocha de Patos de Minas (34% de  $\text{P}_2\text{O}_5$ ), obtendo-se uma concentração final de fósforo de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ . Usaram-se frascos sem *C. rosea* como controle. Mantiveram-se os Erlenmeyers em mesa agitadora a 150 rpm a  $25^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 12 h. Após uma semana, centrifugou-se a cultura fúngica a 8000 rpm por 20 min. Usou-se o sobrenadante para determinar o pH, e estimou-se a quantidade de fósforo solúvel pelo método colorimétrico (Braga & Defelipo, 1974). Executou-se o experimento por duas vezes em DIC em esquema fatorial (4 isolados x 5 fontes de fosfato) com três repetições (uma unidade experimental = um Erlenmeyer). Realizaram-se, para os valores observados, análise de variância e teste de médias (Teste de Tukey,  $\alpha = 0,05$ ), com o Programa SAS v 9.2

## **2.7. Análise dos dados**

Executaram-se os testes de normalidade e o teste de Levene para os experimentos com duas execuções e analisaram-se em conjunto quando se observou homogeneidade de variância entre as execuções.

## **3. Resultados**

### **3.1. Biocontrole do mofo cinzento com aplicação de *Clonostachys rosea* na raiz, parte aérea ou no local de inoculação de *Botrytis cinerea***

Nos experimentos com aplicação dos tratamentos nas raízes e na parte aérea, não houve efeito de interação tratamento x época de aplicação (P sempre maior que 0.1388), nem efeito individual de tratamento ou de época de aplicação (P sempre maior que 0.0848), para a AACPD e para a taxa de expansão da lesão. Com a aplicação em raízes, as médias da AACPD e da taxa de expansão de lesão variaram entre 15.35 - 24.14 e 0.82 - 1.2, respectivamente. Com a aplicação na parte aérea, as médias de AACPD variaram entre 8.25 - 16.31 e as de taxa de expansão de lesão entre 0.43 - 0.75.

No experimento com aplicação no local de inoculação, houve efeito significativo da interação tratamento x época de aplicação, para a AACPD (P=0.0262) e para a taxa de expansão da lesão (P=0.0221), e se analisou dentro de cada fator (Tabela 1). Os valores de AACPD e taxa de expansão da lesão foram menores com a aplicação de *C. rosea* no momento da inoculação de *B. cinerea*. Quando se aplicou *C. rosea* 6 e 4 dias antes da inoculação, também houve redução significativa da AACPD e da taxa de expansão da lesão. Quando se aplicou o antagonista 1 ou 2 dias antes da inoculação, não houve redução significativa da severidade do mofo cinzento (Tabela 1).

### **3.2. Promoção de crescimento de tomateiros por *Clonostachys rosea***

Segundo a análise química do substrato, de maneira geral, os nutrientes reduziram-se com a autoclavagem: as médias das somas de base foram 21,63 e 16,48  $\text{cmol}_c/\text{dm}^3$  no substrato não autoclavado e autoclavado, respectivamente. Por outro lado, o teor de amônia aumentou quatro vezes aproximadamente com a autoclavagem: as médias foram 13,18 e 41,00 mg/Kg no

substrato não autoclavado e autoclavado, respectivamente. O pH não variou substancialmente: 6,16 com autoclavagem e 6,29 sem autoclavagem.

A aplicação dos isolados de *C. rosea* não reduziu o tempo de emergência das sementes, mas aumentou a emergência total, principalmente no substrato autoclavado. As médias conjuntas da emergência em todas as repetições dos dois experimentos no substrato não autoclavado com a aplicação dos isolados de *C. rosea* variou de 52,5 a 66,0%. No substrato autoclavado, a emergência com a aplicação de *C. rosea* variou de 51,2 a 65,0%. Nos tratamentos controle, obtiveram-se 52,5 e 39,0% de emergência no substrato não autoclavado e autoclavado, respectivamente (Tabela 2). No fim do experimento, no substrato autoclavado tratado com os isolados de *C. rosea*, houve redução em aproximadamente 33% no nível de amônia comparado ao substrato autoclavado sem *C. rosea*, exceto com a aplicação do isolado Cr61, para o qual obteve-se o mesmo nível que no substrato sem aplicação.

Não se obteve distribuição normal para altura e número de folhas, e executou-se análise descritiva dos experimentos. Com aplicação dos isolados de *C. rosea*, altura nas plantas aumentou em aproximadamente 0.6 a 3.6 cm independente do tratamento do substrato. O número médio de folhas também aumentou (Tabela 2).

Para as variáveis PFR e PFPA, observou-se distribuição normal dos erros. Detectou-se homogeneidade das variâncias entre as execuções dos dois experimentos, e efetuou-se análise conjunta dos dados de ambos. Para PFR, não houve efeito significativo da interação isolado x tipo de substrato ( $P=0.2129$ ), mas houve efeito significativo dos isolados ( $P < 0,0001$ ) e substrato ( $p=0.0002$ ). Para todos os isolados de *C. rosea*, PFR aumentou independentemente do tratamento do substrato (Tabela 2). Obteve-se maior PFR em substrato autoclavado (2,3g) que no não autoclavado (1,9g). Para o PFPA, houve efeito significativo da interação isolado x tipo de

substrato (Tabela 2). Com a aplicação de *C. rosea*, os valores de PFPA foram maiores no substrato autoclavado. O PFPA aumentou com todos os isolados de *C. rosea*, no substrato não autoclavado, e com Cr61 e Cr62 no substrato autoclavado (Tabela 2).

Detectou-se homogeneidade das variâncias entre as execuções dos experimentos em que se avaliou PSR e PSPA, e efetuou-se análise conjunta dos dados de ambos. No substrato não autoclavado, com a aplicação dos isolados, houve aumento significativo de PSR ( $P = 0,0042$ ) e de PSPA ( $P = 0,0006$ ) (Tabela 2). No substrato autoclavado, não houve efeito significativo da aplicação dos isolados para PSR ( $P = 0,06$ ), mas houve para PSPA ( $P=0,02$ ), principalmente para os isolados Cr60, Cr61 e Cr62 (Tabela 2).

Quando se avaliou a colonização dos tecidos, independentemente em substrato autoclavado ou não, mais de 80% das raízes estavam colonizadas por *C. rosea*. Entre 30-70% dos segmentos de haste estavam colonizados, mais de 90% dos quais concentravam-se no terço inferior da haste. Menos que 1% dos segmentos de folhas estava colonizado.

Na análise nutricional, ferro e zinco tenderam a reduzir e boro a aumentar com aplicação de *C. rosea* no substrato autoclavado ou não, mas não se obteve resultado conclusivo em vista da variabilidade dos dados.

### **3.3. Produção de ácido-indol-3-acético (AIA) por isolados de *Clonostachys rosea***

Com os valores de absorbância obtidos com os isolados, estimaram-se os valores de AIA, os quais não diferiram do obtido no tratamento controle ( $P=0,1757$ ). Portanto, não se obteve evidência de produção de AIA por *C. rosea*.

### **3.4. Produção de sideróforos do tipo hidroxamato por isolados de *Clonostachys rosea***

Os valores de absorvância relacionados aos sideróforos obtidos com os isolados de *C. rosea* foram inferiores ao obtido com o tratamento controle. Portanto, não se obteve evidência de produção sideróforos do tipo hidroxamato por *C. rosea*.

### **3.5. Solubilização de fontes inorgânicas de fosfato por isolados de *Clonostachys rosea***

No experimento em meio NBRIP, não se observou formação de halo transparente ao redor das colônias dos isolados de *C. rosea*.

No experimento de fósforo solúvel em diferentes fontes de fosfatos, não houve efeito significativo da interação isolado x fonte de fosfato ( $P=0.056$ ), mas não houve efeito significativo de isolado ( $P < 0.0001$ ) e para tipo de fosfato ( $P < 0.0001$ ). Todos os isolados de *C. rosea* foram igualmente eficientes em solubilizar fósforo de diferentes fontes de fosfatos (Tabela 3). Adicionalmente, a presença dos isolados de *C. rosea* reduziu o valor médio de pH do meio (Tabela 3). A solubilização de fósforo variou com a fonte de fosfato: em fosfato de cálcio ocorreu maior e em Rocha de Araxá menor solubilização (Tabela 3).

### **Discussão**

Além do efeito direto, os antagonistas podem controlar fitopatógenos indiretamente, pois quando aplicados em local diferente do sítio de infecção podem induzir resistência e/ou promover o crescimento de plantas (Shoresh et al., 2010). *Clonostachys rosea* é eficiente no controle direto de vários patógenos (Sutton et al, 1997; Correa et al., 2010; Rodrigues et al., 2011), bem como em induzir resistência (Lahoz et al., 2004; Roberti, et al., 2008) e promover o crescimento de espécies de plantas (Sutton et al., 2008). Na UFV, selecionaram-se quatro isolados eficientes no controle direto de *B. cinerea* em várias espécies de plantas (Nobre et al., 2005; Cota et al., 2008), inclusive tomateiro (Cap. 2). A aplicação destes isolados teve potencial na indução de resistência em pepineiro a *B. cinerea* (Silva, 2012) e de promoção de crescimento

em mudas de tomateiro (Macedo, 2011). Nesse trabalho, avaliou-se o efeito de aplicação de ASM e dos quatro isolados de *C. rosea*, selecionados na UFV, no local de inoculação de *B. cinerea*, ferimentos em haste, bem como em locais distantes, na indução de resistência de tomateiro ao mofo cinzento. Avaliou-se, também, a promoção de crescimento e possíveis mecanismos associados à promoção.

Testou-se ASM pelo fato de estar registrado como indutor de resistência em tomateiro a vários patógenos. O produto não é registrado para o mofo cinzento do tomateiro, mas com a aplicação na parte aérea 4 dias antes da inoculação de *B. cinerea*, a severidade da doença reduziu-se (Achuo et al., 2004), porém a dose de ingrediente ativo usada foi duas vezes superior à usada no presente trabalho. Mesmo com essa dose elevada, os autores não obtiveram efeito para o mofo cinzento em tabaco, com aplicação do produto na parte aérea ou no solo (Achuo et al., 2004). No presente trabalho, com aplicação da mistura dos quatro isolados de *C. rosea* ou de ASM na parte aérea ou no solo, locais distantes do ponto de inoculação do patógeno, não houve redução da AACPD nem a taxa de expansão da lesão do mofo cinzento no tomateiro, independente da época de aplicação. Similarmente, a aplicação de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride*, espécies taxonomicamente relacionadas a *Clonostachys*, nas sementes, no substrato de semeadura e na cova não controlou o mofo cinzento em tomateiros (Lisboa, 2007). Quando-se aplicaram os quatro isolados de *C. rosea* em sementes e substratos, o período de incubação e a severidade do mofo cinzento foram menores em pepineiros. Também houve aumento das atividades das enzimas polifenoloxidase, peroxidase, quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase, relacionadas à resistência (Silva, 2012). A relação antagonista - planta pode ser dependente da espécie e mesmo da cultivar. Com aplicação de *C. rosea* em raízes de plantas de tabaco, posteriormente inoculadas com *Erysiphe orontii*, a severidade de oídio reduziu-se, e os níveis de

enzimas relacionadas à resistência aumentaram (Lahoz et al., 2004). Com a aplicação do antagonista em sementes de trigo também houve indução de resistência a *Fusarium culmorum* e aumento dos níveis de enzimas relacionadas à resistência (Roberti et al., 2008). Provavelmente, a não eficiência da aplicação de *C. rosea* e ASM no solo e parte aérea em induzir resistência em tomateiro deve-se à alta agressividade e a rapidez de colonização de *B. cinerea*; quando o tomateiro produz os compostos de defesa, a infecção está em estado avançado, e não há inativação do patógeno.

Como esperado, houve controle do mofo cinzento quando se aplicou *C. rosea* no local de inoculação do patógeno. A eficiência de controle foi maior quando se aplicou o antagonista no momento da desbrota e da inoculação de *B. cinerea*. Quando a aplicação foi antes da desbrota e da inoculação do patógeno, a eficiência foi maior aos 4 e 6 dias. *Clonostachys rosea* é endofítico (Sutton et al., 2002) e atua principalmente por competição (Sutton et al., 1997; Morandi et al., 2003), possivelmente o antagonista teve maior tempo para se estabelecer endofiticamente na haste do tomateiro e colonizar o tecido. Assim, como já observado (Sutton et al., 2002), em trabalhos preliminares, os isolados de *C. rosea* usados nesses experimentos suprimiram *B. cinerea* em tomateiro, em diferentes épocas de aplicação (Cap. 2).

Além de induzir resistência, a aplicação de *C. rosea* também promoveu o crescimento de diferentes espécies de plantas (Liu & Sutton., 2002; Sutton et al., 2002; Bennet et al., 2009), inclusive de tomateiro (Ravnskov et al., 2006). Os isolados aqui avaliados são potenciais promotores de crescimento em tomateiro (Macedo, 2011). Além de variar com a espécie de planta ou da cultivar, a promoção de crescimento associada a fungos antagonistas ocorre por diferentes mecanismos: produção de fitohormônios (Martínez-Medina et al., 2011); aumento da

disponibilidade de nutrientes para a planta (Vessey, 2003); produção de compostos voláteis (Ryu et al., 2005); e produção de sideróforos (Vala et al., 2006).

Avaliaram-se alguns mecanismos associados à promoção de crescimento de tomateiros. Não houve efeito da aplicação de *C. rosea*, em substrato autoclavado ou não, na emergência de sementes. A aplicação de *C. rosea* reduziu o tempo de emergência, porém, o efeito depende da espécie de plantas: com o isolado IK 726, reduziu-se o tempo de emergência de sementes de cenoura, mas não de cebola (Bennett et al., 2009). No presente trabalho, o tempo de emergência não se alterou, mas a emergência foi maior com a aplicação do antagonista, principalmente em substrato autoclavado, onde o teor de amônia estava alto após a autoclavagem, o que poderia causar toxidez em plântulas emergindo. Após 15 dias, no substrato autoclavado, o teor de amônia estava 30% menor quando se aplicou *C. rosea*. Assim, o fungo poderia reduzir a população de micro-organismos deletérios às sementes, bem como reduzir o teor de amônia potencialmente tóxico. O aumento da emergência de sementes do tomateiro com aplicação de *C. rosea* já havia sido observado: quando se aplicou o isolado ACM 941 em sementes de ervilha, na presença de *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisii*, *F. solani* f. sp. *pisii*, *Mycosphaerella pinodes*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*, a emergência de plântulas aumentou (Xue et al., 2003).

Considera-se a altura de plantas como indicador da promoção de crescimento (Yedidia et al., 2001). A aplicação de isolados de *C. rosea* aumentou o tamanho de tomateiros e o número médio de folhas após 35 dias da semeadura, em substrato autoclavado ou não. A tendência em aumentar essas variáveis, observada em experimentos preliminares (Macedo, 2011), novamente ocorreu.

Em geral, a aplicação dos isolados de *C. rosea* aumentou os pesos do sistema radicular e da parte aérea de tomateiro. Similarmente, com a aplicação do isolado IK726, aumentou-se o

peso da parte aérea de tomateiros (Ravnskov et al., 2006). Com a aplicação do isolado 88-710, também obtiveram-se aumento do peso de raízes e parte aérea de espécies de plantas (Sutton et al., 2008). Por outro lado, a aplicação de *C. rosea* em sistema hidropônico não afetou o peso radicular e de parte aérea de plantas de alface (Correa et al., 2010). A promoção de crescimento pode ser específica entre isolado do antagonista e espécie de planta (Shoresh et al., 2010). Considerando-se os isolados aqui testados, conclui-se que os quatro podem promover o crescimento de tomateiros. Pretende-se, agora, avaliar se essa promoção resulta em aumento na produtividade.

*Clonostachys rosea* pode se desenvolver endofítica ou epifiticamente em órgãos vegetais saudáveis (Sutton et al., 1997; Nobre et al., 2003). No presente estudo, recuperou-se *C. rosea* dos tecidos avaliados, porém a colonização concentrou-se nas raízes e na região inferior do caule. Em pepineiro, os mesmos isolados de *C. rosea* foram recuperados, principalmente nas raízes e parte inferior da haste, após 50 dias da aplicação em sementes e substrato, mesmo após rigorosa desinfestação superficial, sendo considerados como endofíticos (Silva, 2012). Portanto, considerou-se aqui que o antagonista também colonizou endofiticamente o tomateiro.

Após comprovar a eficiência de *C. rosea* como promotor de crescimento, buscou-se avaliar o mecanismo(s) pelo(s) qual(is) o fungo promove o crescimento de tomateiros. Não se obteve resultado conclusivo quanto à absorção de nutrientes com a aplicação. O uso de um substrato rico em nutrientes pode ter mascarado o efeito da aplicação, pois o efeito de um antagonista ocorre ou é maior em condições de estresse (Bennett et al., 2009). Um dos mecanismos de promoção de crescimento de plantas é o aumento na eficiência de absorção de nutrientes. O isolado IK726 de *C. rosea* promoveu o crescimento em tomateiro, aumentando os níveis de fósforo, mas reduzindo nitrogênio (Ravnskov et al., 2006). *Trichoderma harzianum*

promoveu o crescimento de plantas de pimentão, e ocorreu aumento nas concentrações de fósforo e de ferro em tecidos foliares (Yedidia et al., 2001), e aumentou a eficiência no uso de nitrogênio em plantas de milho (Harman, 2000). A promoção de crescimento e alteração na absorção de nutrientes esperados podem não ocorrer. A aplicação de um isolado de *T. harzianum* não promoveu o crescimento nem alterou as concentrações de nutrientes em folhas, com exceção do enxofre (Alfano et al., 2007). Novamente, esse fato pode ter ocorrido em vista da especificidade relação micro-organismo - e espécie/cultivar de planta ou da ausência de estresse, por exemplo nutricional. A falta de estresse pode mascarar possíveis benefícios do agente promotor ou, sendo uma relação específica micro-organismo- espécie/cultivar, um micro-organismo eficiente em promover o crescimento em uma planta pode ser ineficiente em outras.

A produção de AIA por micro-organismos pode levar ao aumento do o sistema radicular e modificação da morfologia das raízes para facilitar o acesso aos nutrientes no solo (Vessey, 2003). Não se detectou produção de AIA pelos isolados de *C. rosea* avaliados. De 149 isolados fúngicos da rizosfera de eucalipto testados quanto aos mecanismos de promoção de crescimento, 73 isolados sintetizaram AIA; outros isolados possuíam mecanismos diferenciados de promoção de crescimento, e foram incapazes de produzir AIA (Santos, 2011). Portanto, justifica-se avaliar outros mecanismos de promoção de crescimento, como a produção de sideróforos por micro-organismos. O ferro é nutriente de baixa disponibilidade no solo (Yu et al., 2011), e a sua baixa concentração na solução do solo dificulta o crescimento de plantas. Os sideróforos, produzidos por alguns micro-organismos, tem alta afinidade por ferro, e complexam íons do elemento no solo, deixando-o disponível para as plantas. Os isolados de *C. rosea* avaliados não produziram sideróforos.

O fósforo, elemento essencial ao crescimento de plantas, é pouco disponível nos solos brasileiros (Fardeau, 1996). O uso de micro-organismos solubilizadores de fósforo pode aumentar a produção em solos com baixos níveis do elemento. Os quatro isolados de *C. rosea* solubilizaram fósforo das cinco fontes de fosfato avaliadas. Um mecanismo fúngico para solubilizar fósforo é a acidólise, por meio da excreção de prótons H<sup>+</sup> (Jacobs et al., 2002). Possivelmente, *C. rosea* usou esse mecanismo, pois em todos os meios com as respectivas fontes de fosfatos, o pH reduziu-se ao final do cultivo. A solubilização dependeu da fonte de fosfato, fato também relatado para outros fungos (Santos, 2011), possivelmente em vista da maior facilidade de solubilização de algumas fontes de fosfatos. Esse é o primeiro relato da capacidade de *C. rosea* em solubilizar fósforo. Segundo a análise nutricional da parte aérea dos tomateiros, o teor de fósforo nas plantas não aumentou, possivelmente porque no substrato orgânico usado para crescer as plantas, e o elemento não limitou o crescimento. A solubilização de fósforo, com subsequente disponibilização para as plantas, pode ser um dos principais mecanismos de promoção de crescimento de plantas. Em tomateiro, houve promoção de crescimento e aumento dos níveis de fósforo na raiz e parte aérea após a aplicação de *C. rosea* (Ravnskov et al., 2006). Não se observou aumento do elemento na parte aérea da planta, e o acúmulo do elemento pode ter se restringido ao sistema radicular ou existe(m) outro(s) mecanismo(s) de promoção de crescimento envolvido(s). Demandam-se mais estudos para investigar esses potenciais mecanismos.

Como observado por outros autores (Sutton et al., 2002) e em estudos preliminares, *C. rosea* é eficiente no biocontrole direto de *B. cinerea* em tomateiro. O antagonista não suprimiu o mofo cinzento quando aplicado distante do local de inoculação do patógeno, diferentemente do observado em pepino (Silva, 2012), para *Erysiphe orontii* em tabaco (Lahoz et al., 2004) e

*Fusarium culmorum* em trigo (Roberti, *et al.*, 2008). Como os mesmos isolados foram testados em pepineiros (Silva 2012), pode-se testar a aplicação destes isolados, distantes do local de inoculação do patógeno, em outras espécies de plantas e outros patógenos. Além do efeito direto de biocontrole de *B. cinerea*, houve promoção de crescimento do tomateiro. Um mecanismo usado pelo fungo é a solubilização de fósforo. O presente estudo relata a eficiência de *C. rosea* como agente de biocontrole a *B. cinerea* e com promotor de crescimento de tomateiros, o que aumenta o potencial de uso do antagonista no manejo integrado da cultura. O trabalho, para *C. rosea*, é inovador em se avaliar os mecanismos associados à promoção de crescimento de plantas. Devem-se conduzir novos estudos para estudar outros mecanismos de promoção de crescimento. Demanda-se também avaliar o efeito da aplicação de *C. rosea* na produtividade do tomateiro.

## Referências

Achuo EA, Audenaert K, Meziane H, Hofte M (2004) The salicylic acid-dependent defence pathway is effective against different pathogens in tomato and tobacco. *Plant Pathology* 53:65-72.

Alfano G, Lewis IML, Cakir C, Bos JLB, Miller SA, Madden LV, Kamoun S, Hoitink HAJ (2007) Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma hamatum* 382. *Phytopathology* 97: 429-437.

Baloyi MA, Laing MD, Yobo KS (2011) Isolation and in vitro screening of *Bacillus thuringiensis* and *Clonostachys rosea* as biological control agents against sheep nematodes. *African Journal of Agricultural Research* 6: 5047-5054.

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

Braga JM, Defelipo BV (1974) Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solos e materiais vegetal. *Revista Ceres* 21: 73-85.

Bric JM, Bpstock RM, Silverstone SE (1991) Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 535-538.

Calvete EO, Dalbosco M, Pranke M (1992) Avaliação de linhagens e cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) em estufas plásticas na região de Passo Fundo-RS. In: 8º Encontro de Hortaliças da Região Sul e 5º Encontro de Plasticultura da Região Sul, Porto Alegre, RS. p. 35.

Chatterton S, Punja ZK (2012) Colonization of geranium foliage by *Clonostachys rosea* f. *catenulata*, a biological control agent of botrytis grey mould. *Botany-Botanique* 90: 1-10.

Corrêa EB, Bettiol W, Morandi MAB (2010) Controle biológico da podridão de raiz causada por *Pythium aphanidermatum* e promoção de crescimento de alface hidropônica com *Clonostachys rosea*. *Tropical Plant Pathology* 35: 248-252.

Cota LV, Maffia LA, Mizubuti ESG, Macedo PEF, Antunes RF (2008) Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. *Biological Control* 46: 515-522.

Elad Y (1996) Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. *European Journal of Plant Pathology* 102: 719-732.

Elad Y, Williamsom B, Tudzynski P, Delen N (2004) *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems - An introduction. In: Elad Y, Williamsom B, Tudzynski P, Delen N (Eds.) *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. London: Kluwer Academic Publishers. pp.1-8.

FAOSTAT (2010) FAO Statistics division: food and agriculture organization of the united nations. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 04 fev. 2013.

Fardeau JC (1996) Dynamics of phosphate in soils: an isotopic outlook. *Fertility Research* 45: 91-100.

Harman GE (2000) Myths and dogmas of biocontrol - Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* 84: 377-393.

Jacobs H, Boswell GP, Harper FA, Ritz K, Davidson FA, Gadd GM (2002) Solubilization of metal phosphates by *Rhizoctonia solani*. *Mycological Research* 106: 1468-1479.

Kapongo JP, Shipp L, Kevan, Sutton JC (2008) Co-vectoring of *Beauveria bassiana* and *Clonostachys rosea* by bumble bees (*Bombus impatiens*) for control of insect pests and suppression of grey mould in greenhouse tomato and sweet pepper. *Biological Control* 46: 508 – 514.

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

Lisboa BB, Bochese CC, Vargas LK, Silveira JRP, Radin B, Oliveira AMR (2007) Eficiência de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride* na redução da incidência de *Botrytis cinerea* em tomateiro cultivado sob ambiente protegido. *Ciência Rural* 37: 1255-1260.

Liu W, Sutton JC (2002) Effectiveness of microbial agents to protect against *Pythium* root rot in hydroponic cucumber. *Biological and Cultural Tests for Control of Plant Diseases*. 18: 1-2.

Macedo PEF (2011) Promoção de crescimento de plantas mediada por *Clonostachys rosea*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, Brasil.

Martínez-Medina A, Roldán A, Albacete A, Pascual JA (2011) The interaction with arbuscular mycorrhizal fungi or *Trichoderma harzianum* alters the shoot hormonal profile in melon plants. *Phytochemistry* 72: 223-229.

Morandi MAB, Maffia LA, Mizubuti ESG, Alfenas AC, Barbosa JG (2003) Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: a valuable component in Botrytis blight management in commercial greenhouses. *Biological Control* 26: 311-317.

Nobre SAM, Maffia LA, Mizubuti ESG, Cota LV, Dias APS (2005) Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. *Biological Control* 34: 132-143.

Nautiyal CS (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiological Letters* 170: 265-270.

Park YH, Stack JP, Kenerley CM (1992) Selective isolation and enumeration of *Gliocladium virens* and *G. roseum* from soil. *Plant Disease*. 76: 230-235.

Ravnskov S, Jensen B, Knudsen IMB, Bodker L, Jensen DF, Karlínski L, Larsen J (2006) Soil inoculation with the biocontrol agent *Clonostachys rosea* and the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* results in mutual inhibition, plant growth promotion and alteration of soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 3453-3462.

Roberti R, Veronesi A, Cesari A, Cascone A, Di Berardino I, Bertini L, Caruso C (2008) Induction of PR proteins and resistance by the biocontrol agent *Clonostachys rosea* in wheat plants infected with *Fusarium culmorum*. *Plant Science* 175: 339-347.

Rodriguez MA, Cabrera G, Gozzo FC, Eberlin MN, Godeas A (2011) *Clonostachys\_rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. *Journal of Applied Microbiology* 110: 1177-1186.

Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Locy RD, Kloepper JW (2005) Study of mechanisms for plant growth promotion elicited by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Soil* 268: 285-292.

Santos ML (2011) Prospecção de fungos promotores de crescimento vegetal na rizosfera de eucalipto. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, Brasil.

Silva MA, Costa MD, Rocha RB, Borges AC (2007) Formação de ectomicorrizas por monocários e dicários de *Pisolithus* sp. e interações nutricionais em *Eucalyptos grandis*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 31: 917-929.

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

Silva, PRA (2012) Interação *Clonostachys rosea*, Silício e *Botrytis cinerea* em pepineiro. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, Brasil.

Shtienberg D, Elad Y, Niv A, Nitzani Y, Kirshner B (1998) Significance of leaf infection by *Botrytis cinerea* in stem rotting of tomatoes grown in non-heated greenhouses. *European Journal of Plant Pathology* 104: 753-763.

Snow GA (1954) Mycobactin, a growth factor for *Mycobacterium johnei*: II. Degradation and identification of fragments. *Journal of the Chemical Society* 2588-2596.

Sutton JC, Li DW, Peng G, Yu H, Zhang P, Valdebenito-Sanhueza RM (1997) *Gliocladium roseum*: A versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Disease* 81: 316-328.

Sutton JC, Liu W, Huang R, Owen-Going N (2002) Ability of *Clonostachys rosea* to establish and suppress sporulation potential of *Botrytis cinerea* in deleafed stems of hydroponic greenhouse tomatoes. *Biocontrol Science and Technology* 12: 413-425.

Sutton JC, Liu W, Ma J, Brown WG, Stewart JF, Walker GD (2008) Evaluation of the fungal endophyte *Clonostachys rosea* as an inoculant to enhance growth, fitness and productivity of crop plants. *Acta Horticulturae* 782: 279-286.

Vala AK, Dave BP, Dube HC (2006) Chemical characterization and quantification of siderophores produced by marine and terrestrial aspergilla. *Canadian Journal of Microbiology* 52:603-607.

Veloukas T, Leroch M, Hahn M, Karaoglanidis GS (2011) Detection and molecular characterization of boscalid-resistant *Botrytis cinerea* isolates from strawberry. *Plant Disease* 95: 1302-1307.

Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255: 571-586.

Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, van Kan JAL (2007) *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* 8: 561-580.

Xue AG (2003) Biological control of pathogens causing root rot complex in field pea using *Clonostachys rosea* strain ACM941. *Phytopathology* 93: 329-335.

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

Yu X, Ai C, Xin L, Zhou G (2011) The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology* 47: 138-145.

Zhao H, Kim YK, Huang I, Xiao CI (2010) Resistance to thiabendazole and baseline sensitivity to fludioxonil and pyrimethanil in *Botrytis cinerea* populations from apple and pear in Washington State. *Postharvest Biology and Technology* 56: 12-18.

Tabela 1. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e taxa de expansão da lesão do mofo cinzento em tomateiro com aplicação, em diferentes épocas, de água destilada e esterilizada (ADE), acibenzolar-S-metil (ASM) e *Clonostachys rosea* (Cr), no local de inoculação de *Botrytis cinerea*. Médias de oito observações.

Tratamentos	Época de aplicação (dias antes da inoculação de <i>Botrytis cinerea</i> )				
	0	1	2	4	6
	AACPD				
ADE	14.14aA	12.7aA	15.7aA	11aA	11.07aA
ASM	10.64aA	10.4aA	10.92aA	12.13aA	10.9aA
Cr	0.85bB	10.5aA	10.58aA	7.36abB	5.76abB
	Taxa de expansão da lesão				
ADE	0.73aA*	0.65aA	0.74aA	0.62aA	0.55aA
ASM	0.57aA	0.57aA	0.56aA	0.7aA	0.64aA
Cr	0.04bB	0.59aA	0.54aA	0.42abB	0.33abB

\*Médias de cada variável seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si (Teste de Tukey,  $\alpha=0,05$ ).

Tabela 2. Variáveis relacionadas à promoção de crescimento do tomateiro com a aplicação de tratamentos em substrato autoclavado (A) ou não (N). Médias de 40 repetições para porcentagem de emergência; 20 para altura, número de folhas e peso fresco de raiz; e 10 para peso fresco de parte aérea, peso seco de raiz e peso seco de parte aérea.

Tratamento <sup>a</sup>	Emergência (%)		Altura de plantas (cm)		Número de Folhas		Peso fresco da raiz (g)	Peso fresco da parte aérea (g)		Peso seco da raiz (g)		Peso seco da parte aérea (g)	
	A	N	A	N	A	N	*	A	N	A	N	A	N
Água	38.75 (5.5) <sup>b</sup>	52.5 (5.3)	15.2 (0.49)	18.2 (0.52)	3.22 (0.12)	3.57 (0.13)	1.62 C <sup>a</sup>	4.766Ca	3.56 Cb	0.15	0.09 B	0.47 B	0.45 C
Cr19	60.00 (3.5)	62.5 (3.8)	16.7 (0.26)	20.8 (0.50)	3.5 (0.09)	3.97 (0.09)	2.02 B	5.13 BCb	7.75 Aba	0.19	0.17 A	0.56 AB	0.84 AB
Cr60	51.25 (2.7)	57.5 (5.0)	15.8 (0.43)	22.0 (0.56)	3.47 (0.09)	3.94 (0.10)	2.13 B	4.70 Cb	8.65 Aa	0.18	0.18 A	0.6 A	0.92 A
Cr61	52.50 (2.3)	52.5 (3.5)	15.5 (0.35)	21.5 (0.77)	3.45 (0.10)	3.65 (0.09)	2.16 B	6.46 Ab	6.64 Ba	0.2	0.15 A	0.61 A	0.67 B
Cr62	58.75 (5.3)	66.2 (5.3)	17.8 (0.37)	21.2 (0.51)	3.65 (0.08)	3.82 (0.10)	2.51 A	6.41 ABb	7.65 Aba	0.2	0.17 A	0.65 A	0.83 AB
Mistura	65.00 (4.6)	52.5 (5.3)	15.8 (0.37)	19.8 (0.44)	3.48 (0.09)	3.69 (0.11)	2.20 B	5.14 Cb	7.75 ABa	0.15	0.19 A	0.47 B	1.0 A

\* Médias foram agrupadas, não se detectou efeito significativo da interação e substrato.

<sup>a</sup> Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si (Teste de Tukey,  $\alpha = 0,05$ ).

<sup>b</sup> Médias com o erro padrão entre parênteses

Tabela 3. pH e fósforo (P) solúvel disponível, em meio líquido NBRIP após a aplicação de tratamentos e de fontes de fosfato ao meio. Médias de três e de 15 repetições para pH e P solúvel, respectivamente.

Fonte de fosfato	pH					P solúvel mg/L
	Controle	Cr 19	Cr 60	Cr 61	Cr 62	
Fosfato de Cálcio	6.75	6.11	6.11	6.14	6.03	33.65 A <sup>*</sup>
Fosfato de Ferro	3.95	2.87	2.8	2.86	2.81	28.85 AB
Fosfato de Alumínio	5.28	3.26	3.24	3.23	3.25	26.73 B
Rocha de Patos	5.89	4.82	4.85	4.83	4.89	12.66 C
Rocha de Araxá	5.73	5.54	5.49	5.58	5.41	12.24 C
P solúvel mg/L	10.83 b <sup>*</sup>	27.33 a	26.49 b	25.95 b	23.53 b	

<sup>a</sup> Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si (Teste de Tukey,  $\alpha = 0,05$ ).

## CAPÍTULO 5

### **Interação *Clonostachys rosea*-tomate na presença e ausência de *Botrytis cinerea***

#### **Resumo**

*Clonostachys rosea*, agente de biocontrole de doenças de plantas, é encontrado em diversos habitats, coloniza diferentes tecidos onde sobrevive, é endofítico; tem fácil produção de propágulos e pode promover o crescimento de plantas. O antagonista é eficiente no controle do mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea*, em diferentes culturas, como o tomateiro. Apesar do conhecimento a respeito da eficiência, há poucos estudos quanto à interação do antagonista em níveis histológicos. Portanto, por meio de microscopia confocal, estudaram-se as interações antagonista - tomateiro - patógeno. *Clonostachys rosea* sobreviveu nos tecidos do tomateiro, no mínimo por 30 dias, entre 18 a 30 °C. O antagonista coloniza hastes feridas do tomateiro mais rápida e eficientemente que o patógeno. A colonização de tecidos foliares por *C. rosea*, na concentração de conídios usada no experimento, foi lenta e deficiente. Isso, somado ao fato de que o patógeno pode penetrar diretamente nas folhas, pode levar a falhas no controle biológico. Observou-se, ainda, que *C. rosea* parasita hifas do patógeno, penetra no tecido foliar do tomateiro pelos estômatos e coloniza os espaços intercelulares das hastes. A colonização radicular é abundante, com uma rede densa de hifas associadas às raízes nas junções das células epidérmicas, evidência de que o fungo penetra nas raízes. Este estudo ajudará a definir estratégias de aplicação de *C. rosea* em tomateiros, visando o biocontrole ou a promoção de crescimento.

## 1. Introdução

*Clonostachys rosea*, anteriormente classificado como *Gliocadium roseum*, é um hifomiceto que produz conídios unicelulares em conidióforos dos tipos penicilado e verticilado (Schroers et al., 1999). O fungo ocorre em diferentes habitats, como regiões tropicais, temperadas e desérticas e, apesar de ocorrer naturalmente no solo, o fungo pode colonizar restos culturais e caules, folhas, frutos, sementes e raízes de plantas daninhas e cultivadas (Sutton et al., 1997). Adicionalmente, o fungo pode colonizar endofiticamente tecidos verdes de diversas espécies de plantas (Lubeck et al., 2002; Morandi et al., 2001; Sutton et al., 2002; 1997).

Tem-se enfatizado o uso de *C. rosea* no controle biológico de doenças de plantas. Além das características citadas acima, o fungo produz grande quantidade de propágulos (Jensen et al., 2002) e pode controlar diferentes patógenos do solo ou da parte aérea em diferentes condições ambientais (Sutton et al., 1997; Lahoz et al., 2004, Roberti et al., 2008; Correa et al., 2010; Rodrigues et al., 2011). Entre os patógenos controlados, encontra-se *Botrytis cinerea* Pers.:Fr, agente causal do mofo cinzento.

*Botrytis cinerea* é um fungo necrotrófico que causa doença em mais de 200 espécies de plantas, incluindo ornamentais, hortícolas, fruteiras, cereais e essências florestais, em condições de sementeira, viveiro, campo, casa de vegetação, armazenamento e transporte (Jarvis, 1992; Sutton et al., 1997; Williamson et al., 2007; Jasper et al., 2013; Leroch et al., 2013). Além da ampla gama de hospedeiros, *B. cinerea* é de difícil controle, principalmente com fungicidas, pelo fato de haver seleção de isolados insensíveis a fungicidas. Nesse contexto, tem-se buscado outras estratégias de controle, como o biológico. *Clonostachys rosea* é um dos antagonistas avaliados para controlar o patógeno. O antagonista foi eficiente no controle do mofo cinzento em

plantas de gerânio, begônia, ciclâmen, pimentão, tomate, pepino, framboesa, rosa, alfafa, tabaco, eucalipto e morango (Sutton et al. 1997; Nobre et al., 2005; Cota et al., 2008ab; Roberti et al., 2008; Correa et al., 2010; Zaldúa & Sanfuentes, 2010), nas quais suprimiu *B. cinerea* por competição (por nutrientes e/ou na colonização de tecido) e hiperparasitismo (Li et al., 2002; Sutton et al., 2002; Cota et al., 2008a).

Em tomateiro, o antagonista pode reduzir o mofo cinzento em hastes (Sutton et al., 2002) e em folhas (Shafia et al., 2001; Nobre et al., 2005). Selecionaram-se quatro isolados de *C. rosea* em condições brasileiras que foram 100% eficientes em suprimir o mofo cinzento em folíolos destacados do tomateiro (Nobre et al., 2005). O antagonista também reduziu a esporulação de *B. cinerea* no filoplano (Shafia et al., 2001). Em cultivo hidropônico, *C. rosea* foi tão eficiente quanto o fungicida iprodione no controle do mofo cinzento em ferimentos em haste, feitos para simular os tratos culturais da cultura (Sutton et al., 2002). Na Unidade de Controle Biológico (UCB), vem se avaliando esses quatro isolados, com resultados promissores (cap.2).

A eficiência em controlar o mofo cinzento relaciona-se à adaptabilidade de *C. rosea*, em diferentes condições ambientais e órgãos da planta, e por atuar por mais de um mecanismo de antagonismo. Apesar de se conhecer a eficiência do antagonista, há poucos estudos histológicos que relacionam *B. cinerea*, *C. rosea* e a planta hospedeira. Acredita-se que este conhecimento ajudará a elucidar características do antagonismo, o que será útil para aprimorar o controle biológico do mofo cinzento. Assim, por meio de microscopia confocal, avaliaram-se: i) a interação *C. rosea* e diferentes tecidos do tomateiro e; ii) a interação *B. cinerea* e *C. rosea* em hastes e folhas, considerando os principais locais de infecção do patógeno.

## 2. Material & Métodos

### 2.1. Procedimentos gerais

Executaram-se os experimentos na UCB do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa e no Delaware Biotechnology Institute da University of Delaware, EUA.

Do isolado ToV<sub>1b</sub>, de *B. cinerea* (Nobre et al., 2003), que estava preservado desde 2004 em discos de micélio pelo método Castellani, depositaram-se os discos em meio de batata-dextrose-ágar (BDA) em placas de Petri. Incubou-se a 20°C, fotoperíodo de 12 h e, das bordas da colônia com crescimento ativo, retiraram-se discos de BDA com micélio (1 cm de diâmetro) que foram transferidos para ferimentos, realizados com ponta de estilete, em fragmentos de pecíolo de tomateiro com aproximadamente 5 cm de comprimento. Mantiveram-se os fragmentos inoculados sobre tela de nylon e espuma umedecida, em caixas tipo Gerbox, acondicionadas a 20 °C e 12h de fotoperíodo. Após 5 dias, observou-se esporulação abundante no tecido e, através de isolamento direto, transferiram-se conídios para BDA. Repicou-se para BDA em tubos, que foi mantido a 20±2°C, fotoperíodo de 12h. Após 12 dias, suspenderam-se os conídios em água destilada esterilizada, com auxílio de bastão de vidro, filtrando-os em duas camadas de gaze. Para as inoculações, ajustou-se a suspensão para 1x10<sup>5</sup> conídios.mL<sup>-1</sup>, com auxílio de um hemacitômetro.

Usou-se mistura dos quatro isolados de *C. rosea* - NCR19/F, NCR60/F, NCR61/F e NCR62/F (Nobre et al., 2005), doravante denominados CR19, CR60, CR61 e CR62. Cultivou-se cada isolado em meio BDA, a 25 °C e fotoperíodo de 12h. Após 12 dias, suspenderam-se os conídios em água destilada esterilizada, filtrou-se em duas

camadas de gaze e se ajustou a suspensão para  $1 \times 10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>, com o auxílio de um hemacitômetro.

Fixaram-se as amostras usadas na microscopia confocal em 2% paraformaldeído e 1% glutaraldeído em tampão fosfato salino (TBS) (20 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,05% NaN<sub>3</sub>, 0,05% Tween 20, pH 7,5) por, no mínimo, 72 h. Amostras lavadas em três mudanças sucessivas em TBS por 15 min, foram coradas em calcofluor-white por 20 min em temperatura ambiente e lavadas por três mudanças sucessivas de TBS por 15 min. Visualizaram-se as amostras em um microscópio invertido confocal Zeiss 510 com objetivas Zeiss de 25x (NA 0.8) Plan-Apochromat ou 40x (NA 1.1) C-Apochromat. Adquiriram-se as imagens usando uma combinação de dois lasers para excitação, 405 e 488 nm, e dois filtros para emissão da imagem, 505 longpass e 420-480 bandpass.

## **2.2. Colonização de folhas de tomateiro por *Clonostachys rosea***

Pulverizou-se a suspensão da mistura dos isolados de *C. rosea* em tomateiro ‘Santa Clara’ de 60 dias, usando-se um atomizador De Vilbiss. Usaram-se plantas tratadas com água destilada e esterilizada (ADE) como testemunha. Mantiveram-se as plantas em câmara de crescimento de 18, 22, 26 e 30 °C, fotoperíodo de 12 h. Após 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias da aplicação do antagonista, confeccionaram-se dez discos foliares, com 1 cm de diâmetro, os quais foram depositados em placas de Petri com meio Paraquat-Cloranfenicol-Ágar (PCA). Mantiveram-se as placas a 25 °C e, após 12 dias, avaliou-se a presença de *C. rosea* nos discos.

Executou-se o experimento por duas vezes em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial (4 temperaturas x 7 avaliações), com três repetições (uma unidade experimental = uma planta).

## **2.3. *Clonostachys rosea* como fungo endofítico em tomateiro**

Avaliou-se a capacidade de *C. rosea* em colonizar endofiticamente tomateiros adultos, cultivados em casa de vegetação, e mudas crescidas em ambiente axênico. Em 40 tomateiros ‘Santa Clara’ cultivados por 60 dias em casa de vegetação, efetuou-se a desbrota, retirando-se um broto no terço superior e uma folha no terço médio, com auxílio de tesoura de poda. Em 20 plantas, inoculou-se *B. cinerea*, pulverizando-se a suspensão em folhas e inoculando uma gota de 30 µL em hastes. Em outras 20 plantas, pulverizou-se ADE. Mantiveram-se todas as plantas em câmara de crescimento a 22 °C, fotoperíodo de 12 h.

Após 24 h, aplicou-se *C. rosea*, pulverizando-se suspensão dos conídios em folhas e aplicando uma gota de 30 µL em hastes, em metade das plantas inoculadas com *B. cinerea* e em metade das plantas tratadas com ADE. Usaram-se plantas sem a inoculação do patógeno e sem a aplicação de *C. rosea* para comprovar a ausência de propágulos nos tecidos. Mantiveram-se todas as plantas em câmara de crescimento a 22 °C, fotoperíodo de 12 h. Após 6, 24, 48 e 144 h da aplicação, coletaram-se as amostras dos tecidos das hastes e das folhas, que foram fixados, corados e visualizados em microscópio confocal. Em hastes, além de cortes transversais, fizeram-se também cortes longitudinais. Usaram-se no mínimo 20 fragmentos de cada tecido para a visualização.

Avaliou-se se *C. rosea* colonizaria endofítica e sistemicamente mudas. Imergiram-se sementes de ‘Santa Clara’ na suspensão de conídios de *C. rosea* ou em ADE por 1 h. Plantaram-se duas sementes no substrato orgânico comercial Tropstrato<sup>®</sup> esterilizado em saco de polipropileno (12.5 x 25 cm) com abertura para trocas gasosas. Mantiveram-se todas as plantas em câmara de crescimento a 25 °C, fotoperíodo de 12 h. Após 40 dias de crescimento, confeccionaram-se discos (1 cm de diâmetro) de folíolos e fragmentos (1 cm) de hastes e raízes. Todo o material foi fixado, corado, e visualizado

no microscópio confocal. Para a visualização, usaram-se no mínimo 20 discos/fragmentos de cada tratamento e órgão.

### **3. Resultados**

#### **3.1. Colonização de folhas de tomateiro por *Clonostachys rosea***

*Clonostachys rosea* colonizou todos os discos de folhas avaliados, independente da época de amostragem e da temperatura em que se mantiveram os tomateiros. Em plantas tratadas com ADE, observou-se colonização de aproximadamente 5% dos discos de folhas.

#### **3.2. *Clonostachys rosea* como fungo endofítico em tomateiro**

Não se observaram propágulos de *B. cinerea* nem de *C. rosea* nos discos de folíolos e fragmentos de hastes e raízes de tomateiros adultos e mudas tratadas com ADE.

Visualizaram-se tecidos da haste antes e após a aplicação de *C. rosea* em diferentes intervalos (Fig.1). Observaram-se os conídios germinando 6 h após a aplicação (Fig. 1B). Após 48 h, grande parte do tecido estava ocupada pelas hifas do fungo (Fig. 1C); 144 h após a aplicação, o tecido estava totalmente colonizado (Fig. 1D).

Observou-se colonização rápida dos tecidos da haste por *C. rosea*, 24 h após a inoculação de *B. cinerea* (Fig 2). Observaram-se algumas hifas de *B. cinerea* entre 6 e 24 h após aplicação de *C. rosea*, o último predominava no tecido. A partir de 48 h, *C. rosea* colonizava abundantemente os tecidos, e hifas de *B. cinerea* eram raras. Após 144 h da aplicação do antagonista, o tecido estava bastante colonizado por *C. rosea* (Fig. 2D). Observou-se, ainda, uma hifa bastante desenvolvida de *B. cinerea* onde ocorria uma região de estrangulamento, possivelmente pelo parasitismo por *C. rosea*. Também após 144 h da aplicação, observou-se a abundante colonização por *C. rosea*, e

visualizaram-se conidióforos dos tipos penicilado e verticilado (Fig. 2E) ou exclusivamente do tipo verticilado (Fig. 2F).

Em cortes longitudinais das hastes do tomateiro, observou-se colonização endofítica dos espaços intercelulares por *C. rosea* (Fig 3).

Visualizou-se, também, a colonização de folhas por *C. rosea*, após ser aplicado em diferentes intervalos (Fig 4). Nas folhas, o fungo não colonizou tão abundantemente os tecidos como ocorreu nas hastes. Observou-se a penetração do antagonista através de estômatos.

Visualizou-se a colonização de *C. rosea*, 24 h após a inoculação de *B. cinerea*, em diferentes intervalos (Fig. 5). Não se observaram *C. rosea* e *B. cinerea* no mesmo campo de visualização nas primeiras horas após a aplicação do antagonista. Observaram-se a germinação de conídios de *B. cinerea* e início do processo de penetração direta no tecido foliar (Fig 5A e 5B). Observou-se a interação *C. rosea* e *B. cinerea* (Fig 5C e 5D), com parte da hifa do patógeno sendo parasitada pelo antagonista (Fig. 5C). Também se observou o antagonista penetrando no tomateiro através de estômatos (Fig. 5C). Observou-se, ainda, o tecido bastante colonizado pelo antagonista com a presença de apenas uma hifa do patógeno (Fig 5D).

Por problemas no ajuste da metodologia, não se conseguiu observar *C. rosea* no interior dos tecidos avaliados. O fungo colonizou abundantemente as raízes e os espaços das junções das células epidérmicas. Além das raízes, o antagonista colonizou o caule externamente, porém a colonização se restringiu ao terço inferior. Não se observou o fungo colonizando folhas (Fig. 6).

#### **4. Discussão**

*Clonostachys rosea* é antagonista eficiente a *B. cinerea* em diversas espécies vegetais, inclusive tomateiro (Shafia et al., 2001; Sutton et al., 2002). Além de controlar o patógeno, *C. rosea* pode aumentar a peso fresca e seca do tomateiro (capítulo 4). Sabe-se que o fungo é endofítico em tecidos de plantas (Sutton et al., 1997) e age por competição (Cota et al., 2008a) e/ou hiperparasitismo (Li et al., 2002). Porém, há poucos estudos, em nível microscópico, envolvendo a interação do antagonista com a planta hospedeira e patógeno (Chatterton et al., 2008; Chatterton & Punja, 2012). Nesse contexto, estudou-se microscopicamente a interação *C. rosea* - *B. cinerea* - tomateiro.

Para maior eficiência, um agente de biocontrole precisa sobreviver em diferentes condições (Fravel, 2005). Portanto, avaliou-se o efeito da temperatura na sobrevivência do antagonista em tomateiros com 60 dias, época a partir da qual as plantas são mais suscetíveis a *B. cinerea* (capítulo 1). Recuperou-se *C. rosea* em 100% dos discos de folhas avaliados durante os 30 dias do experimento, independente da temperatura entre 18 e 30 °C. Outros autores obtiveram resultados similares: na avaliação do estabelecimento e colonização do morangueiro, *C. rosea* desenvolveu-se melhor a 24 °C, apesar de haver intensa colonização dos tecidos entre 20 e 30 °C (Cota et al., 2008b). Conseguiu-se recuperar *C. rosea* após três meses de aplicação em hastes de tomateiro, mesmo em locais distantes do ponto de aplicação (Sutton et al., 1997). Também em hastes do tomateiro, *C. rosea* sobreviveu por mais de 70 dias (Sutton et al., 2002). Não se avaliou a sobrevivência do antagonista nas raízes. Sabe-se, porém, que *C. rosea* pode sobreviver por longos períodos na rizosfera, onde se multiplica (Bennett et al., 2008; Xue, 2003). Segmentos de raízes de pepineiro permaneceram colonizados após 60 dias a partir da aplicação de *C. rosea* f. *catenulata* (Chatterton et al., 2008). Essas características são importantes para um agente de biocontrole, pois demonstram a

amplitude térmica em que pode ser usado e o longo período de sobrevivência do agente. Um longo período de sobrevivência pode reduzir o número de aplicações em tomateiro, que possui ciclo entre 100-130 dias. Além disso, *C. rosea* se estabelece e coloniza os tecidos da cultura na faixa de temperatura em que se cultiva o tomateiro.

Após avaliar a sobrevivência de *C. rosea* no tecido, estudou-se o comportamento do fungo nos diferentes tecidos do tomateiro, interagindo ou não com *B. cinerea*. Os maiores problemas que o mofo cinzento causa em tomateiros resultam de lesões na haste, oriundas de ferimentos durante podas ou colheita (Dik et al., 1999), ou do avanço das infecção em folhas (Shtienberg et al., 1998). Assim, primeiro observou-se a aplicação de *C. rosea* em hastes feridas do tomateiro, onde se faz a remoção de folhas: o antagonista colonizou rápida e abundantemente o tecido. Após 48 h, as hifas do antagonista estavam bem desenvolvidas e, após 144 h após a aplicação, o tecido estava totalmente recoberto pelas hifas. Quando se inoculou *B. cinerea* 24 h antes de *C. rosea*, o desenvolvimento do patógeno foi mais lento que o de *C. rosea*. Este fato comprova a eficiência do antagonista em competir com o patógeno por espaço e nutrientes, um dos mecanismos de antagonismo de *C. rosea* (Sutton et al., 1997; Cota et al., 2008a). Como a remoção de folhas serve como porta de entrada para *B. cinerea*, o sucesso na colonização do tecido ferido por *C. rosea* deve resultar na exclusão de *B. cinerea* desse potencial sítio de infecção.

O antagonista também atua por hiperparasitismo (Li et al., 2002; Rivera et al., 2009). Apesar de este fenômeno ter sido observado raramente, possivelmente pela eficiência de *C. rosea* na colonização do tecido e inibição de *B. cinerea*, observaram-se regiões da hifa do patógeno com estrangulamento, porém não se visualizaram hifas do antagonista penetrando nas hifas do patógeno. A visualização dessa região da hifa com

estrangulamento em contato com hifas de *C. rosea* é forte indicação de que o antagonista parasita o patógeno. Já se observaram hifas de *C. rosea* penetrando em hifas de *B. cinerea* e as estrangulando (Morandi et al., 2001). Demanda-se nesse tipo de estudo que pelo menos uma das espécies, *B. cinerea* ou *C. rosea*, seja transformada com genes que sintetizam proteínas fluorescentes ou que se consiga corá-las independentemente, usando anticorpos específicos, por exemplo.

Outra característica importante visualizada em hastes do tomateiro foi a produção de conidióforos e conídios por *C. rosea* no interior dos tecidos. Visualizaram-se mais conidióforos verticilados que penicilados, os dois tipos de conidióforos produzidos pelo antagonista (Sutton et al., 1997). Assim, além de se estabelecer nos tecidos e os colonizar, *C. rosea* se reproduz nos tecidos da planta hospedeira, o que explica, em parte, porque o antagonista permanece nos tecidos por longos períodos. Em estudos preliminares, visualizou-se colonização de *C. rosea* em tecidos de plantas hospedeiras, nos quais o fungo não foi aplicado. Possivelmente, *C. rosea* reproduziu-se no tecido onde foi aplicado; posteriormente, os conídios dispersaram-se para as plantas vizinhas. *Clonostachys rosea* é considerado endofítico, como em raízes de cevada (Lubeck et al., 2002) e tecidos verdes de roseira (Morandi et al., 2001) e tomateiro (Sutton et al., 2002; 1997). Nesses trabalhos as avaliações são indiretas, e quantificou-se o antagonista em meio de cultura após rigorosa desinfestação dos tecidos colonizados. Em vista da capacidade endofítica, o antagonista pode permanecer por longo tempo nos tecidos e já pode estar presente quando o patógeno chega. Ademais, como endofítico, o agente de biocontrole fica menos exposto a condições adversas do ambiente. Em cortes longitudinais de hastes do tomateiro, observou-se que o antagonista coloniza intercelularmente os tecidos. A colonização intercelular por fungos endofíticos já é

conhecida: O isolado CECT 2413 de *Trichoderma harzianum* colonizou os espaços intercelulares de raízes de tomate (Chacón et al., 2007). Pelo que sabemos, este é o primeiro relato de observação direta de *C. rosea* como fungo endofítico em hastes do tomateiro. Também é a primeira constatação de colonização intercelular pelo fungo.

A infecção em haste, o principal problema do mofo cinzento do tomateiro, pode ser resultante do avanço da infecção em folhas (Shtienberg et al., 1998). Portanto, estudou-se, também, a aplicação do antagonista associada ou não à inoculação do patógeno em folhas do tomateiro. Diferentemente das hastes, a colonização foliar pelo antagonista é lenta. Mesmo após 144 h da aplicação, as hifas do antagonista estavam pouco ramificadas e havia pouca cobertura do tecido foliar por *C. rosea*. Para *C. rosea* f. *catenulata* a colonização de plantas de gerânio também foi menor em folhas que em hastes feridas (Chatterton & Punja, 2012). Possivelmente, a colonização lenta ou deficiente deve-se ao fato de que a superfície foliar é limitada em termos de nutrientes, além de sofrer grande variação de umidade (Andrews & Harris, 2000). *Botrytis cinerea* requer nutrientes exógenos aos tecidos da planta para a germinação, desenvolvimento e infecção (Huang et al., 2000). Provavelmente, isso também ocorre para *C. rosea*. A variação da eficiência do biocontrole de doenças foliares é atribuída à colonização inconsistente do tecido da planta (Daughtrey and Benson, 2005). Assim, dependendo das condições, *C. rosea* pode ser ineficiente no controle de doenças foliares. Uma forma de contornar este problema seria a aplicação de conídios em maior concentração. Essa concentração pode variar com o hospedeiro (Nobre et al., 2005) e deve ser bem estabelecida.

Espécies de *Botrytis* podem penetrar no tecido do hospedeiro por aberturas naturais, ferimentos e/ou diretamente (Holz et al., 2004). No presente estudo,

obtiveram-se evidências de que o patógeno penetra diretamente nas folhas de tomateiro; não se observou o patógeno penetrando através de estômatos. Sabendo-se que o patógeno penetra diretamente nos tecidos foliares e que o avanço da infecção resulta em lesões no caule, a deficiência de *C. rosea* em colonizar este tipo de tecido pode levar a falhas no controle do mofo cinzento. Como comentado, uma alternativa seria aumentar a concentração de conídios do antagonista ou avaliar fatores - umidade, nutrientes, época de aplicação - que possam influenciar na colonização do antagonista.

*Clonostachys rosea* foi considerado como endofítico em tomateiro por meio de rigorosa desinfecção externa do tecido e observação da colonização em meio de cultura (Sutton et al., 1997). Os autores também afirmam que o antagonista penetra diretamente nos tecidos da planta. Diferentemente dessa afirmativa, não se visualizou a penetração direta de folhas de tomateiro por *C. rosea*. Por outro lado, frequentemente, observaram-se hifas do fungo próximo dos estômatos ou penetrando através deles. Também já se visualizaram hifas de *C. rosea* f. *catenulata* em estômatos de gerânio (Chatterton & Punja, 2012). Não se visualizaram hifas no interior dos tecidos foliares. Caso *C. rosea* penetre somente por estômatos e colonize ineficientemente tecidos foliares, é possível que *B. cinerea*, o qual penetra diretamente no tecido, tenha vantagem temporal/espacial sobre o antagonista. É necessário comparar isolados do antagonista quanto à penetração. Se o isolado Pg 88-710 de *C. rosea* (Sutton et al., 1997) penetra diretamente, pode-se tentar obter outros isolados que também o façam e superem a vantagem aparente de *B. cinerea*.

Ainda no exterior do tecido foliar, observaram-se hifas de *C. rosea* envolvendo hifas do patógeno, semelhante ao que acontece com espécies antagonistas de *Trichoderma*. As hifas do antagonista entram em contato com hifas da espécie

parasitada, onde enovelam-se e secretam enzimas para penetrar no hospedeiro (Cheng et al., 2012). Estas etapas do processo de parasitismo de *C. rosea* foram visualizadas por outros autores: hifas de *C. rosea* estabeleceram contato firme com conídios e tubos germinativos de *B. cinerea*, iniciando o processo de infecção, havendo penetração direta da hifa do antagonista, sem formação de apressório (Li et al., 2002); *C. rosea* também estabeleceu contato de hifas com *B. allii*, mas sem penetração (Pachenari & Dix, 1980); hifas de *C. rosea* entraram em contato e envolveram hifas de *B. cinerea* (Rivera et al., 2009). *Clonostachys rosea* pode também produzir enzimas (Khan et al., 2006) e compostos do metabolismo secundário (Rodriguez et al., 2011) com ação contra antimicrobiana. Observaram-se compostos com efeito fungistático (Cap.3), que provavelmente atuem no processo de parasitismo.

Além de hastes e folhas, também se aplicou *C. rosea* em sementes e promoveu-se visualizar o fungo em raízes, hastes e folhas de tomateiros. Observou-se colonização abundante nas raízes, após 40 dias. Assim, o antagonista possivelmente coloniza os tecidos das sementes e, posteriormente desenvolve-se nas raízes durante a emergência. As raízes liberam exsudados que auxiliam no aumento da população de microrganismos no rizoplane e na rizosfera (Andrews & Harris, 2000), o que pode ter auxiliado na colonização por *C. rosea*. Essa colonização pode proteger as sementes germinadas de patógenos do solo (Chatterton et al., 2008). Já se observaram outros fungos antagonistas também colonizando abundantemente raízes de plantas hospedeiras, como *C. rosea* f. *catenulata* em raízes de pepineiro por 60 dias após a aplicação (Chatterton et al., 2008), e o isolado CECT 2413 de *Trichoderma harzianum* em raízes de tomateiro, principalmente através dos espaços intercelulares (Chacón et al., 2007). Como *T. harzianum* em pepineiro, no presente estudo *C. rosea* formou uma densa rede

na epiderme das raízes, com as hifas associadas à junção das células epidérmicas, uma indicação de que o fungo também penetra nas raízes. Em hastes, observou-se colonização somente até o terço médio de tomateiros, o que corrobora o observado em estudos preliminares (dados não publicados). Em folhas, não se observou colonização do antagonista. Conclui-se que *C. rosea*, apesar de colonizar eficientemente raízes e o terço médio das hastes, não coloniza eficientemente o tomateiro sistemicamente quando aplicado na raiz, e se restringe aos órgãos da planta próximos ao local de aplicação.

Neste estudo pioneiro, observaram-se características de *C. rosea* desconhecidas ou, até então, especulativas. O antagonista coloniza mais rápida e eficientemente hastes do tomateiro, porém, na concentração aplicada (usual em estudos de biocontrole) não colonizou tecidos foliares. Observou-se *C. rosea* penetrando via estômato e colonizando os espaços intercelulares, primeiro relato desses fenômenos. Observaram-se, ainda, hifas de *B. cinerea* com estrangulamento e envolvidas por hifas de *C. rosea*. Quanto ao parasitismo a *B. cinerea*, os estudos são contraditórios. Apesar de não ter sido visualizado e avaliado nesse estudo, propõe-se que, semelhante a espécies de *Trichoderma*, o processo de parasitismo por *C. rosea* envolve diferentes etapas. Acredita-se que este estudo ajudará a definir estratégias de aplicação do fungo como agente de biocontrole ou como promotor de crescimento de plantas.

## Referências

- Andrews JH, Harris RF (2000) The ecology and biogeography of organisms on plant surfaces. *Annual Review of Phytopathology* 38: 145-180.
- Bennett AJ, Whipps JM (2008) Dual application of beneficial microorganisms to seed during drum priming. *Applied Soil Ecology* 38: 83-89.
- Chacón MR, Rodríguez-Galán O, Benítez T, Sousa S, Rey M, Llobell A, Delgado-Jarana J (2007) Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. *International Microbiology* 10: 19-27.

- Chatterton S, Jayaraman J, Punja ZK (2008) Colonization of cucumber plants by the biocontrol fungus *Clonostachys rosea* f. *catenulate*. *Biological Control* 46: 267-278.
- Chatterton S, Punja ZK (2012) Colonization of geranium foliage by *Clonostachys rosea* f. *catenulate*, a biological control agent of botrytis grey mould. *Botany* 90: 1-10.
- Cheng CH, Yang CA, Peng KC (2012) Antagonism of *Trichoderma harzianum* ETS 323 on *Botrytis cinerea* mycelium in culture conditions. *Phytopathology* 102: 1054-1063.
- Cota LV, Maffia LA, Mizubuti ESG, Macedo PEF, Antunes RF (2008a) Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. *Biological Control* 46: 515-522.
- Cota LV, Maffia LA, Mizubuti ESG (2008b) 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.
- Corrêa EB, Bettiol W, Morandi MAB (2010) Controle biológico da podridão de raiz causada por *Pythium aphanidermatum* e promoção de crescimento de alface hidropônica com *Clonostachys rosea*. *Tropical Plant Pathology* 35: 248-252.
- Daughtrey ML, Benson DM (2005) Principles of plant health management for ornamental plants. *Annual Review of Phytopathology* 43: 141-169.
- Dik AJ, Koning G, Kohl J (1999) Evaluation of microbial antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* stem infection in cucumber and tomato. *European Journal of Plant Pathology*. 105: 115-122.
- Fourie JF, Holz G (1995) Initial infection processes by *Botrytis cinerea* on nectarine and plum fruit and the development of decay. *Phytopathology* 85: 82-87.
- Fravel DR (2005) Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 43: 337-359.
- Holz G, Coertze S, Williamsom (2004) The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. In: Elad Y, Williamson B, Tudzinski P, Delen N (Eds) *Botrytis: biology, pathology and control*. The Netherlands. Kluwer Academic Publishers. pp. 319-331.
- Hsieh TF, Huang JW, Hsiang T (2001) Light and scanning electron microscopy studies on the infection of oriental lily leaves by *Botrytis elliptica*. *European Journal of Plant Pathology* 107: 571-581.
- Huang HC, Acharya SN, Erickson RS (2000) Etiology of alfalfa blossom blight caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology* 9: 11-16.
- Jarvis WR (1992) *Managing diseases in greenhouse crops*. Harrow: APS Press. 288 p.

Jasper MV, Seyb AM, Trought MCT, Balasubramaniam R (2013) Overwintering grapevine debris as an important source of *Botrytis cinerea* inoculum. *Plant Pathology* 62: 130-138.

Jensen B, Knudsen IMB, Jensen DF (2002) Survival of conidia of *Clonostachys rosea* on stored barley seeds and their biocontrol efficacy against seed-borne *Bipolaris sorokiniana*. *Biocontrol Science and Technology* 12: 427-441.

Khan A, Williams KL, Nevalainen HKM (2006) Infection of plant-parasitic nematodes by *Clonostachys rosea* and *Monacrosporium lysipagum*. *Biological Control* 51: 659-678.

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

Leroch M, Plesken C, Weber RWS, Kauff F, Scalliet G, Hahn M (2013) Gray mold populations in German strawberry fields are resistant to multiple fungicides and dominated by a novel clade closely related to *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology* 79: 159-167.

Li GQ, Huang HC, Kokko EG, Acharya SN (2002) Ultrastructural study of mycoparasitism of *Gliocladium roseum* on *Botrytis cinerea*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 43: 211-218.

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

Morandi MAB, Maffia LA, Sutton JC (2001) Development of *Clonostachys rosea* and interactions with *Botrytis cinerea* in rose leaves and residues. *Phytoparasitica* 29: 103-113.

Nobre SAM, Maffia LA, Mizubuti ESG, Cota LV, Dias APS (2005) Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. *Biological Control* 34: 132-143.

Pachenari A, Dix NJ (1980) Production of toxins and wall degrading enzymes by *Gliocladium roseum*. *Transactions of the British Mycological Society* 74: 561-566.

Rivera MC, Lopez MV, Lopez SE (2009) Mycobiota from *Cyclamen persicum* and its interaction with *Botrytis cinerea*. *Mycologia* 101: 173-181.

Roberti R, Veronesi A, Cesari A, Cascone A, Di Berardino I, Bertini L, Caruso C (2008) Induction of PR proteins and resistance by the biocontrol agent *Clonostachys rosea* in wheat plants infected with *Fusarium culmorum*. *Plant Science* 175: 339-347.

Rodriguez MA, Cabrera G, Gozzo FC, Eberlin MN, Godeas A (2011) *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. *Journal of Applied Microbiology* 110: 1177-1186.

Schroers HJ, Samuels GJ, Seifert KA, Gams W (1999) Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. *Mycologia* 91: 365-385.

Shafia A, Sutton JC, Yu H, Fletcher RA (2001) Influence of preinoculation light intensity on development and interactions of *Botrytis cinerea* and *Clonostachys rosea* in tomatoes leaves. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23:346-357.

Shtienberg D, Elad Y, Niv A, Nitzani Y, Kirshner B (1998) Significance of leaf infection by *Botrytis cinerea* in stem rotting of tomatoes grown in non-heated greenhouses. *European Journal of Plant Pathology* 104: 753-763.

Sutton JC, Li DW, Peng G, Yu H, Zhang P, Valdebenito-Sanhueza RM (1997) *Gliocladium roseum* a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Disease* 81: 316-328.

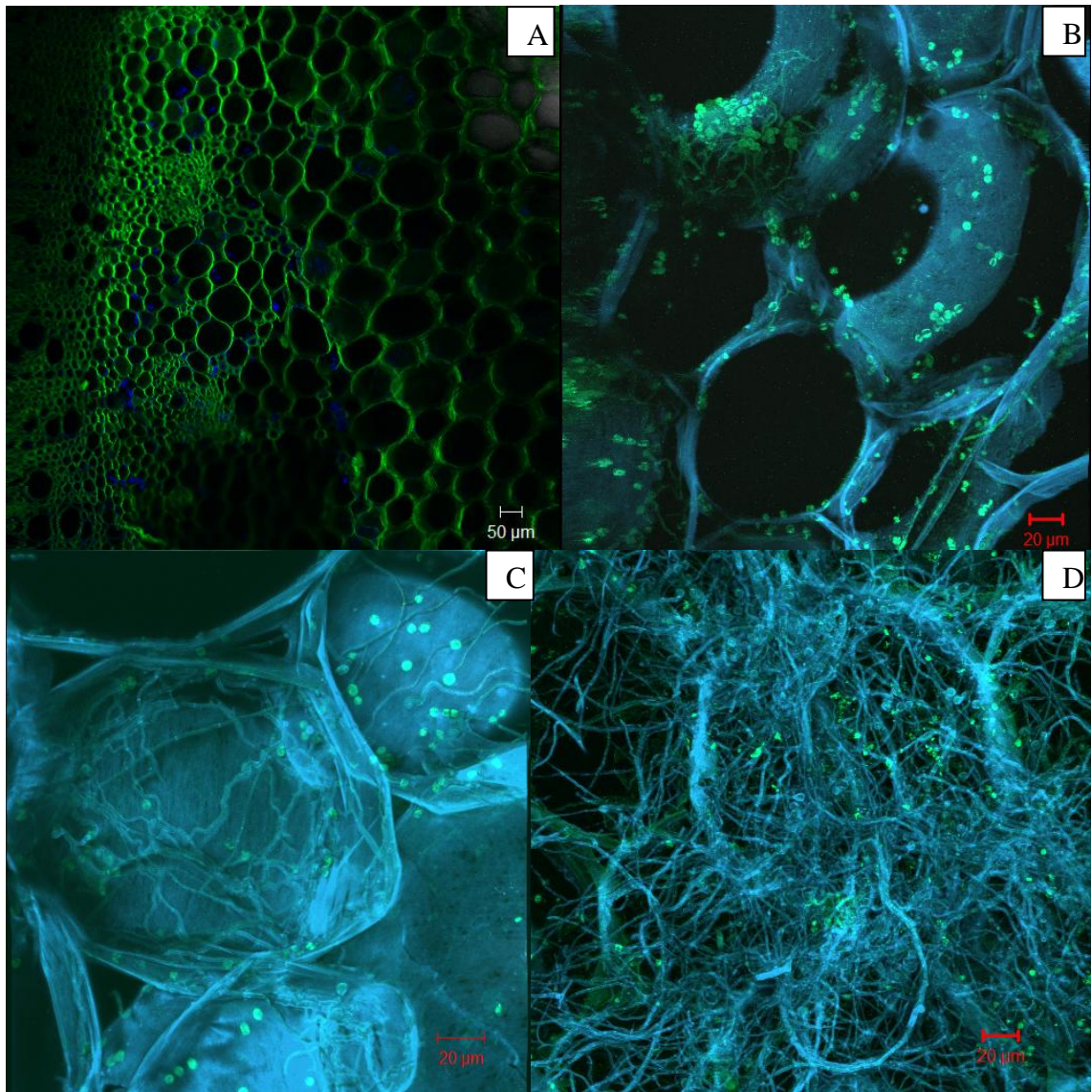
Sutton JC, Liu W, Huang R, Owen-Going N (2002) Ability of *Clonostachys rosea* to establish and suppress sporulation potential of *Botrytis cinerea* in deleafed stems of hydroponic greenhouse tomatoes. *Biocontrol Science and Technology* 12: 413-425.

Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, van Kan JAL (2007) *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* 8: 561-580.

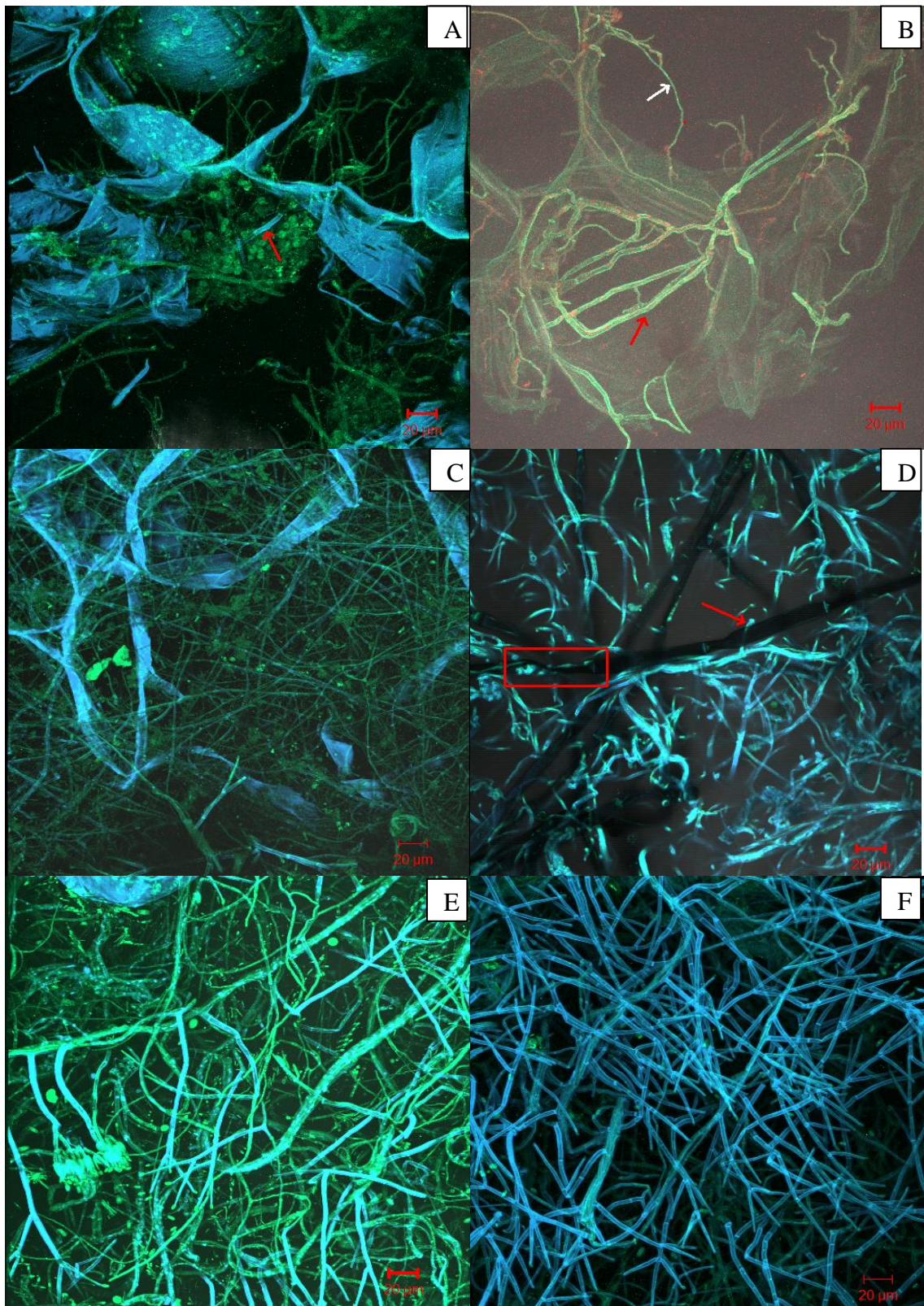
Xue AG (2003) Biological control of pathogens causing root rot complex in field pea using *Clonostachys rosea* strain ACM941. *Phytopathology* 93: 329-335.

Yohalem DS (2004) Evaluation of fungal antagonists for grey mould management in early growth of pot roses. *Annals of Applied Biology* 144: 9-15.

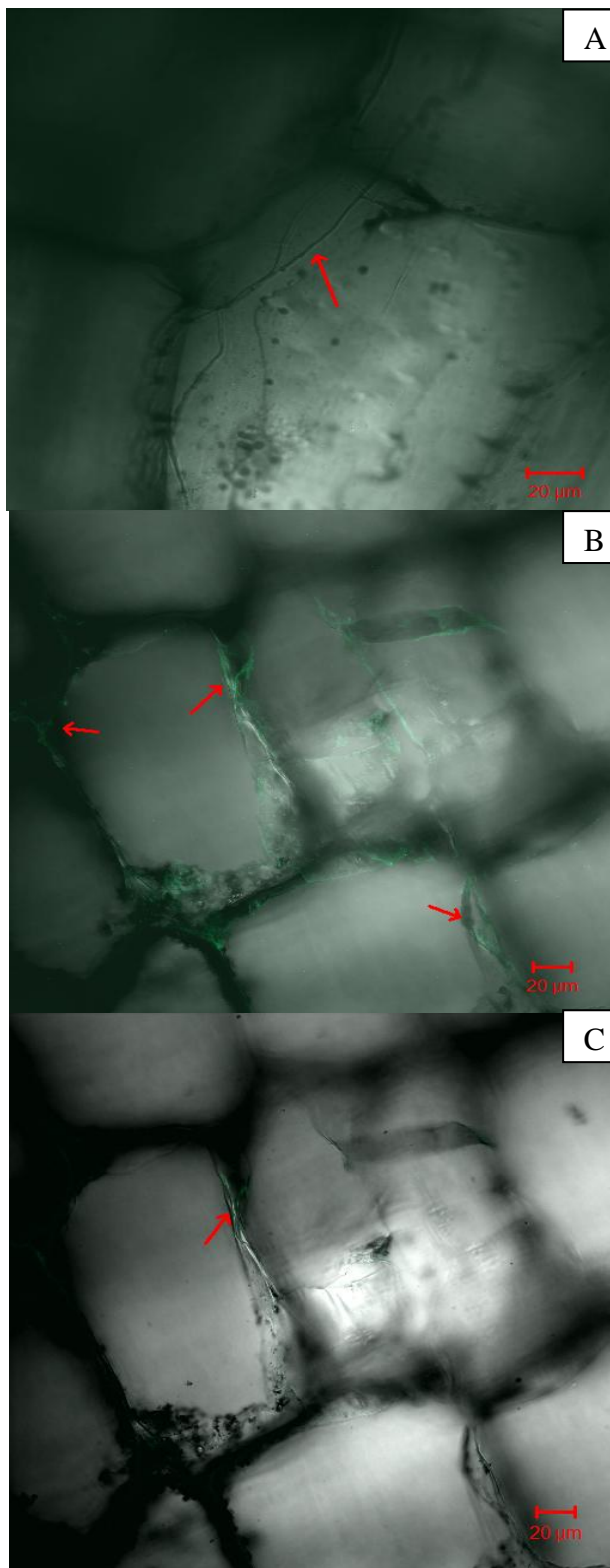
Zaldúa S, Sanfuentes E (2010) Control of *Botrytis cinerea* in *Eucalyptus globulus* mini-cuttings using *Clonostachys rosea* and *Trichoderma* strains. *Chilean Journal of Agricultural Research* 70: 576-582.



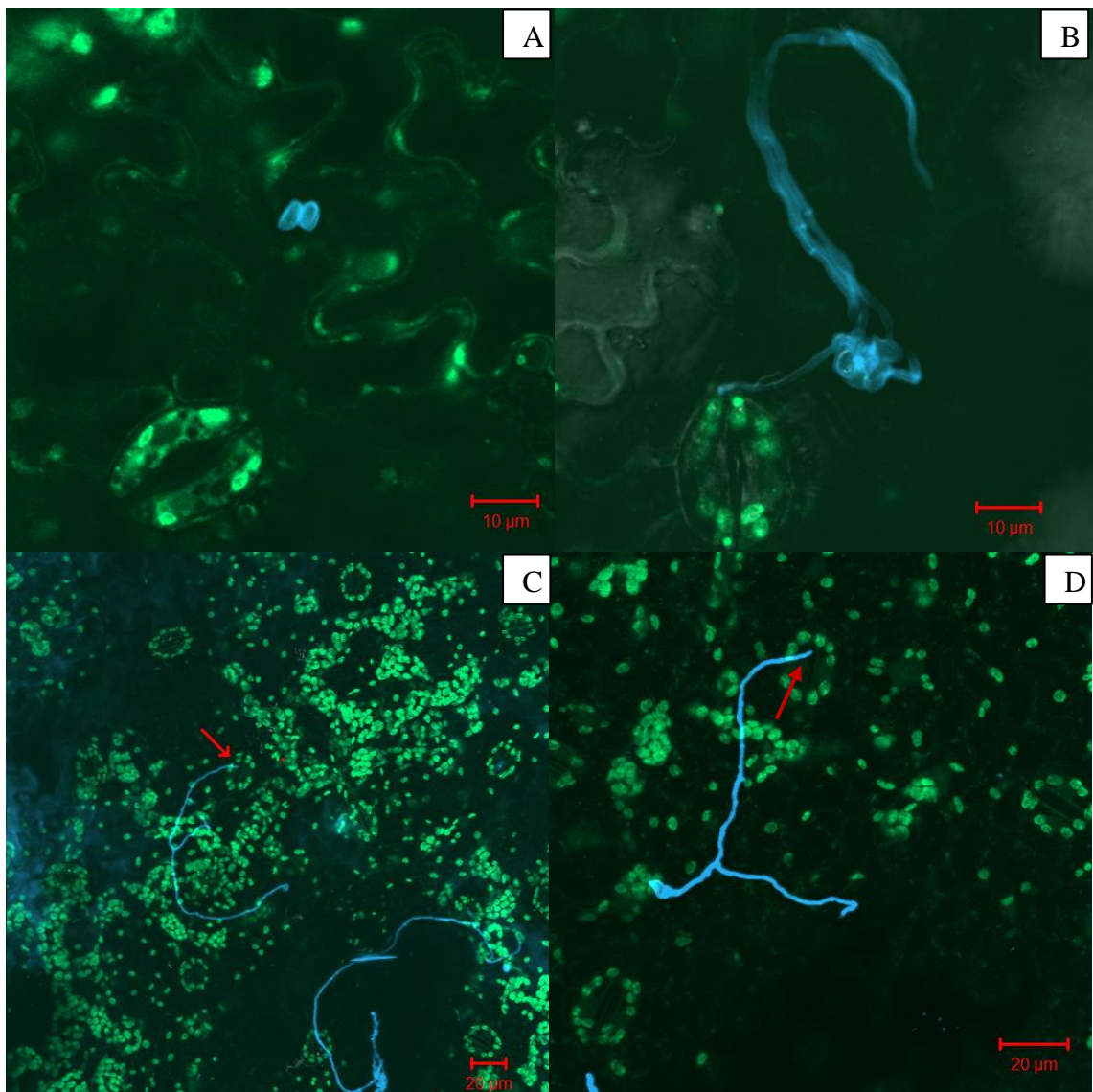
**Figura 1.** Microscopia confocal de corte de hastes do tomateiro sem e com aplicação de *Clonostachys rosea*. **A.** sem aplicação; **B, C e D** - após 6, 48 e 144 h da aplicação, respectivamente.



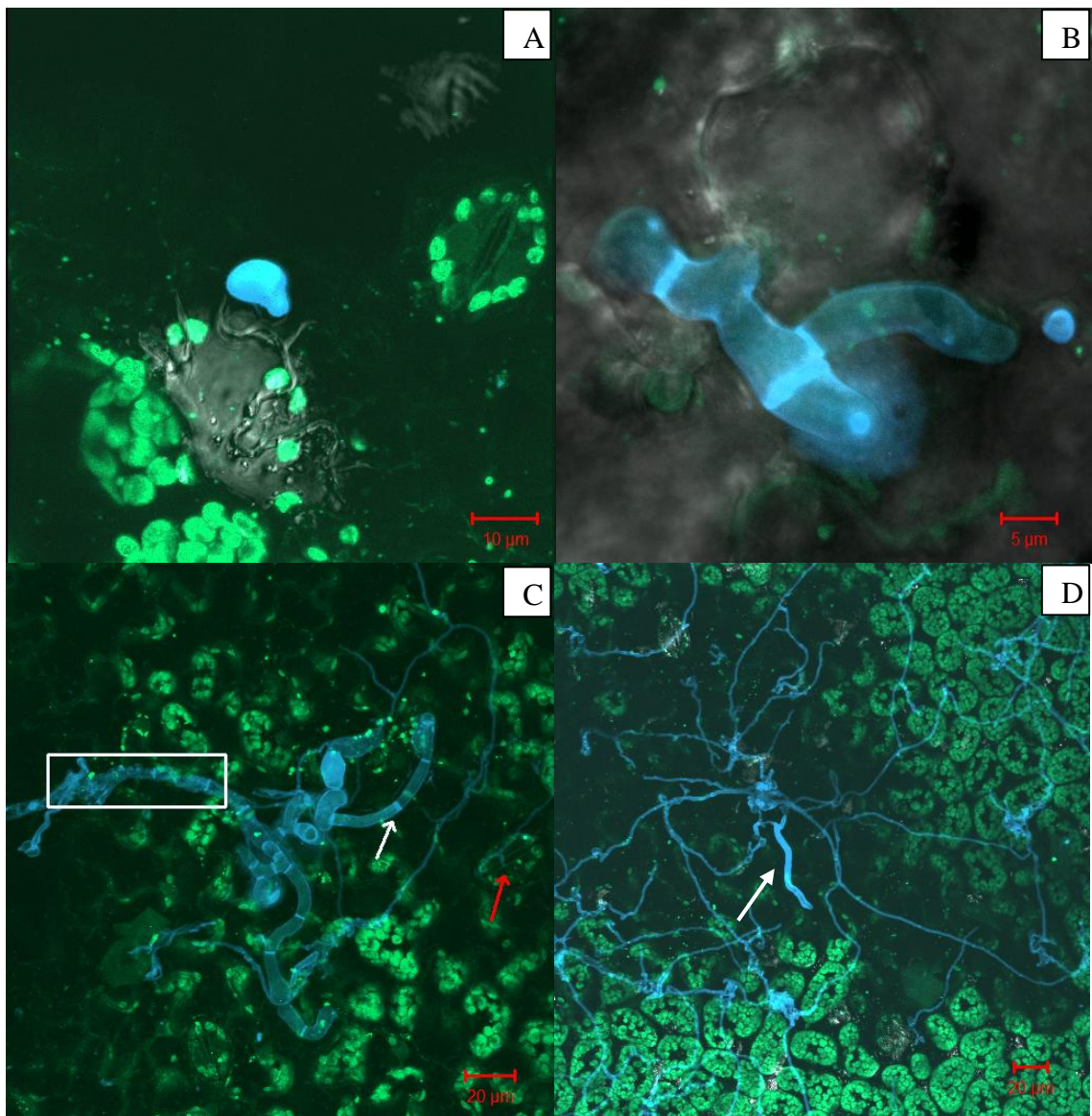
**Figura 2.** Microscopia confocal de cortes de hastes do tomateiro com inoculação de *Botrytis cinerea* 24 h antes da aplicação de *Clonostachys rosea*. Visualização após a aplicação do antagonista em diferentes intervalos. **A.** 6 h; **B.** 24 h; **C.** 48 h; **D, E e F.** 144 h. Seta branca = hifa de *C. rosea*; seta vermelha = hifa de *B. cinerea*; retângulo vermelho = região da hifa do patógeno com estrangulamento.



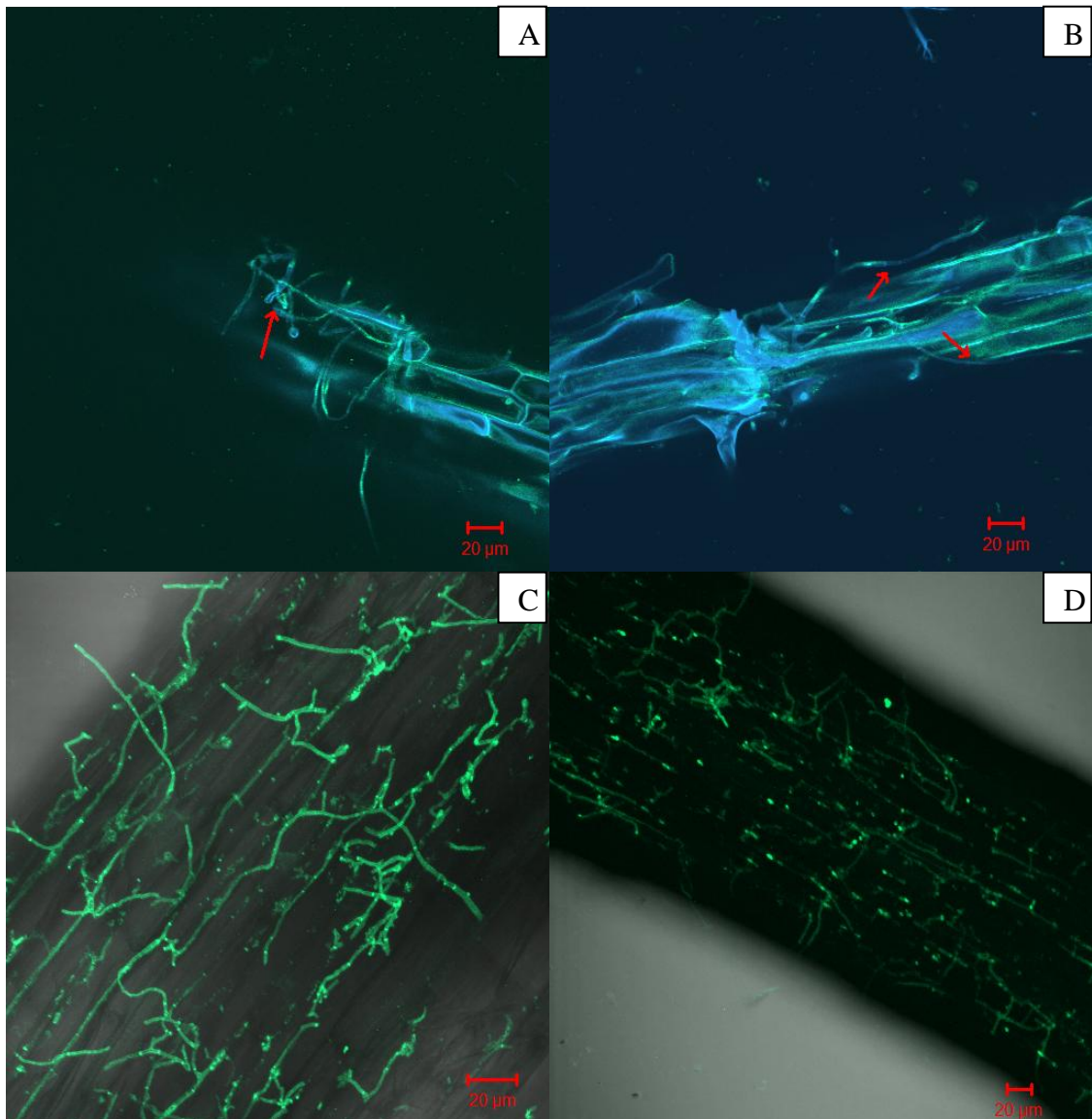
**Figura 3.** Microscopia confocal de cortes longitudinais de hastes de tomateiro. **A, B e C.** Visualização longitudinal das células da haste do tomateiro com colonização intercelular das células por *Clonostachys rosea*. Setas vermelhas = hifas do antagonista



**Figura 4.** Microscopia confocal de folhas do tomateiro com aplicação de *Clonostachys rosea*. **A.** conídios após 6 h da aplicação; **B.** conídios germinados, próximo ao estômato, após 24 h da aplicação; **C e D.** germinação dos conídios de *Clonostachys rosea* com hifas após 48 e 144 h da aplicação, respectivamente. Setas vermelhas = hifas de *C. rosea* tendendo a penetrar através dos estômatos.



**Figura 5.** Microscopia confocal de folhas do tomateiro inoculadas com *Botrytis cinerea* 24 h antes da aplicação de *Clonostachys rosea*. **A.** conídio de *B. cinerea* 6 h após a aplicação de *C. rosea*; **B.** conídios germinados de *B. cinerea* penetrando no tecido diretamente, 24 h após a aplicação do antagonista; **C e D.** tecido com hifas do antagonista e do patógeno 48 e 144 h após a aplicação do antagonista, respectivamente. Setas brancas = hifas de *B. cinerea*; seta vermelha = hifas de *C. rosea* tendendo a penetrar através do estômato, retângulo branco = hifas do antagonista envolvendo hifas do patógeno.



**Figura 6.** Microscopia confocal de raízes e hastes de tomateiro 40 dias após aplicação de *Clonostachys rosea* em sementes mantidas em ambiente estéril. **A e B.** Parte externa do terço inferior do caule com colonização de *C. rosea*; **C e D.** abundante colonização de raízes pelo antagonista. Setas vermelhas = hifas do antagonista no segmento de caule.

## CONCLUSÕES

- Tomateiros próximo ao período de florescimento são mais suscetíveis a *B. cinerea*, bem como os tecidos de hastes mais jovens;
- Os quatro isolados de *C. rosea* selecionados controlam o mofo cinzento em hastes de tomateiro, principalmente com aplicação a partir de  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>;
- A aplicação de *C. rosea* aumentou o peso do sistema radicular e da parte aérea, mas não induziu resistência em tomateiro a *B. cinerea*;
- *Clonostachys rosea* é endofítico em tomateiro, colonizando os espaços intercelulares de hastes;
- Em tomateiro, *C. rosea* atua por competição de espaço/nutriente, hiperparasitismo e/ou produzindo composto(s) orgânico(s) deletério(s) a *B. cinerea*.