

MARCELO AUGUSTO BOECHAT MORANDI

INFLUÊNCIA DE FATORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS NO ESTABELECIMENTO DE *CLONOSTACHYS ROSEA* EM TECIDOS DE ROSEIRA E CONTROLE BIOLÓGICO DE *BOTRYTIS CINEREA* PELO ANTAGONISTA EM RESTOS CULTURAIS.

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

2001

A minha esposa Virgínia

e ao meu filho André,

***DEDICO .***

A Deus, pela capacitação e consolo a todo tempo.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo no Brasil e no exterior (University of Guelph, Canadá).

Aos Professores Luiz A. Maffia e John C. Sutton, pela amizade e orientação.

Aos colegas de curso.

Aos amigos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

***AGRADEÇO .***

## **BIOGRAFIA**

MARCELO AUGUSTO BOECHAT MORANDI é Engenheiro Agrônomo pela Universidade Federal de Viçosa, em fevereiro de 1995, onde também obteve o título de Mestre em Fitopatologia, em fevereiro de 1997.

Em março do mesmo ano, iniciou o curso de Doutorado em Fitopatologia, pela Universidade Federal de Viçosa e University of Guelph – Canadá (Doutorado Sandwich).

## CONTEÚDO

	Página
RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	viii
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
CAPÍTULO 1 .....	5
Manejo Integrado de doenças causadas por <i>Botrytis cinerea</i>	
1. Introdução .....	6
2. Etiologia e epidemiologia da doença .....	6
3. Princípios de manejo das doenças causadas por <i>Botrytis</i> .....	9
4. Manejo integrado: uma necessidade .....	14
5. Referências .....	15
CAPÍTULO 2 .....	20
Effects of host and microbial factors on development of <i>Clonostachys rosea</i> and control of <i>Botrytis cinerea</i> in rose.	
Abstract .....	21
1. Introduction .....	21
2. Materials and Methods .....	22
3. Results .....	25
4. Discussion .....	28
5. References .....	30
CAPÍTULO 3 .....	31
Relationships of aphid and mite infestations to control of <i>Botrytis cinerea</i> by <i>Clonostachys rosea</i> in rose ( <i>Rosa hybrida</i> ) leaves.	
Abstract .....	32
1. Introduction .....	32
2. Materials and Methods .....	33
3. Results and Discussion .....	35
4. References .....	40
CAPÍTULO 4 .....	42
Redução da esporulação de <i>Botrytis cinerea</i> por <i>Clonostachys rosea</i> em restos culturais como componente no manejo do mofo cinzento em roseiras.	
Resumo .....	43
1. Introdução .....	44
2. Material e Métodos .....	47
3. Resultados .....	52
4. Discussão .....	62
5. Referências .....	65
CONCLUSÕES GERAIS .....	68

## RESUMO

MORANDI, Marcelo Augusto Boechat, D.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2001. **Influência de fatores bióticos e abióticos no estabelecimento de *Clonostachys rosea* em tecidos de roseira e controle biológico de *Botrytis cinerea* pelo antagonista em restos culturais.** Professor Orientador: Luiz Antonio Maffia. Professor Co-Orientador: John Clifford Sutton. Professores Conselheiros: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti e Acelino Couto Alfenas.

Objetivou-se avaliar o controle biológico de *B. cinerea* por *C. rosea*, como componente do manejo integrado do mofo cinzento em roseiras, com as seguintes hipóteses de trabalho: i- *C. rosea* pode colonizar endofiticamente, diferentes tecidos de roseira, em diferentes estádios de desenvolvimento; ii- *C. rosea* possui habilidade saprofítica para se estabelecer na comunidade microbiana dos restos culturais de roseira; iii- *C. rosea* coloniza eficientemente ferimentos nos tecidos de roseira e limita a colonização do patógeno; e iv- *C. rosea* reduz eficientemente a produção de inóculo de *B. cinerea* em condições de cultivo protegido.

*Clonostachys rosea* germinou, estabeleceu endofiticamente e esporulou abundantemente, em tecidos maduros, senescentes ou mortos. A germinação foi mais alta em tecidos mortos (>98% de conídios germinados) que em folhas e pétalas maduras e senescentes (31% a 47%). Quando folhas maduras foram feridas antes da aplicação de *C. rosea*, o número de conídios germinados dobrou, mas a área com esporulação do fungo não se alterou e foi alta (>75%). Em folhas maduras, aplicou-se *C. rosea* imediatamente ou até 24 h após ferimento, e, a seguir, inoculou-se *B. cinerea*; a germinação do patógeno reduziu-se em até 41% e a esporulação em mais de 99%. O período de 24h de alta umidade, antes das aplicações em folhas senescentes e mortas, estimulou o crescimento de fungos indígenas presentes e reduziu a esporulação de *C. rosea* e *B. cinerea*. Em folhas mortas, a associação de fungos indígenas com *C. rosea* contribuiu para o controle do patógeno. Entretanto, quando aplicados em alta densidade de esporos, *Penicillium* sp. e *Alternaria alternata* interagiram negativamente com *C. rosea* e reduziram sua eficiência em 16 e 21%, respectivamente.

Em folhas, estudou-se o efeito de infestações de pulgões (*Macrosiphum rosae* L.) e de ácaros (*Tetranychus urticae* Koch) no crescimento e esporulação de *C. rosea* e *B. cinerea* e na supressão do patógeno pelo antagonista. A germinação dos dois fungos foi maior nas folhas previamente infestadas por pulgões e ácaros. Na

aplicação combinada *C. rosea*+*B. cinerea*, em folhas não infestadas, o antagonista suprimiu a germinação do patógeno em mais que 50%, mas, nas infestadas, a germinação do patógeno foi alta (>75%). A infestação com pulgões e ácaros aumentou significativamente a esporulação de *C. rosea*, independentemente da presença de *B. cinerea*, e a de *B. cinerea*, quando inoculado isoladamente. Entretanto, na aplicação combinada, o antagonista suprimiu quase que completamente a esporulação do patógeno, tanto nas folhas infestadas quanto nas não infestadas.

Em condições de casa de vegetação, avaliaram-se os efeitos de *C. rosea* na esporulação de *B. cinerea* e de variáveis climáticas sobre a colonização dos restos culturais de roseiras ('Sônia' e 'Red Success') por ambos os fungos. Em ambas as cultivares, a esporulação do patógeno foi consistentemente reduzida em 30 a 50% nos tratamentos onde se aplicou *C. rosea* (*C. rosea* e *C. rosea*+mancozeb, para 'Red Success', e *C. rosea*, para 'Sônia'). Na aplicação de *C. rosea*+mancozeb, a esporulação do antagonista reduziu-se em 10 a 15%, ao longo do ensaio, apesar de não ter reduzido significativamente o controle da esporulação de *B. cinerea*. Nos tratamentos onde foi aplicado, *C. rosea* estabeleceu-se eficientemente nos restos culturais de roseira, em vista do incremento da sua esporulação a cada avaliação, pelo alto valor da área abaixo da curva de esporulação do antagonista e pela redução crescente na esporulação de *B. cinerea*. Entretanto, não houve redução significativa da incidência da doença, provavelmente, porque as aplicações de *C. rosea* iniciaram-se ao final de janeiro, quando a epidemia do mofo cinzento já estava em estágio avançado; não se realizaram práticas de saneamento ao longo do ensaio; e nem todas as roseiras da casa de vegetação foram tratadas com *C. rosea*, o que permitiu a multiplicação do patógeno. Entretanto, espera-se que, em casas de vegetação, mesmo sob condições favoráveis ao patógeno, a aplicação de *C. rosea* ao longo de vários ciclos produtivos possa reduzir a população de *B. cinerea* e, conseqüentemente, a incidência do mofo cinzento em botões. A umidade relativa máxima foi o principal fator de estímulo à colonização de ambos os fungos, por sua influência direta no teor de umidade dos restos culturais; enquanto a umidade relativa mínima e a temperatura máxima reduziram a colonização de ambos, por estarem associadas ao dessecamento dos restos. O fato de os requerimentos ambientais para os dois fungos serem similares é relevante em termos do estabelecimento de estratégias de controle biológico de *B. cinerea*.

## ABSTRACT

MORANDI, Marcelo Augusto Boechat, D.S., Universidade Federal de Viçosa, February of 2001. **Effects of biotic and abiotic factors on *Clonostachys rosea* establishment on rose tissues and biological control of *Botrytis cinerea* by the antagonist on rose debris.** Advisor: Luiz Antonio Maffia. Co-Advisor: John Clifford Sutton. Committee Members: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti and Acelino Couto Alfenas.

To evaluate the biological control of *B. cinerea* by *C. rosea* as a component of the integrated management of rose gray mould, the following hypothesis were tested: i- *C. rosea* is able to grow endophytically on different rose tissues at different developmental stages; ii- *C. rosea* is able to establish on the microbial community of rose debris; iii- *C. rosea* is able to colonize wounds and restrict the growth of the pathogen in rose tissues; and iv- *C. rosea* can inhibit *B. cinerea* sporulation on rose debris in commercial greenhouse.

*Clonostachys rosea* germinated, established, and sporulated abundantly on mature, senescent, and dead tissues. Germination was higher on dead tissues (>98%) than on mature and senescent tissues (31% to 47%). On wounded mature leaves, germination of *C. rosea* was twice higher than on non-wounded leaves. The area covered by conidiophores was not affected by wounds and was high (>75%) on all instances. On mature leave that were wounded, inoculated with *C. rosea* immediately or until 24 h after wounded, and challenge inoculated with the pathogen, the germination of *B. cinerea* was reduced by 41% and the sporulation on more than 99%. When senescent and dead leaves were subjected to a 24h of high humidity before the inoculations, the growth of indigenous fungi was stimulated and the sporulation of both *C. rosea* and *B. cinerea* was reduced. The association of the indigenous fungi with *C. rosea* contributed for the control of the pathogen on dead leaves. However, when applied on high inoculum density, *Penicillium* sp. and *Alternaria alternata* interacted negatively with *C. rosea* and reduced the antagonist efficiency by 16 and 21%, respectively.

The effects of aphids (*Macrosiphum rosae* L.) and mites (*Tetranychus urticae* Koch) infestations on growth and sporulation of *C. rosea* and *B. cinerea* and on the control of the pathogen by the antagonist were evaluated on rose leaves. When applied alone, the germination of both fungi was greater on infested leaves than on the control leaves. In the combined application, *C. rosea* inhibited the germination of the

pathogen on non-infested leaves by 50%. However, on infested leaves the germination of *B. cinerea* was high (>75%) despite the presence of the antagonist. Similarly, the infestations of aphids and mites increased the sporulation of both *B. cinerea* and *C. rosea* when each fungus was applied alone. However, in the combined application *C. rosea* inhibited the sporulation of *B. cinerea* on more than 99% on infested and non-infested leaves.

The reduction on *B. cinerea* sporulation by *C. rosea* and the effects of climatic factors on pathogen and antagonist growth on rose debris of 'Sônia' and 'Red Success' plants were evaluated in a plastic covered greenhouse. For both cultivars, *B. cinerea* sporulation was consistently reduced by 30 to 50% on the treatments where *C. rosea* was applied (*C. rosea* and *C. rosea*+mancozeb, for 'Red Success', and *C. rosea*, for 'Sônia'). When *C. rosea* was associated with mancozeb, fungal sporulation was reduced by 10 to 15%, but the efficiency of the antagonist in controlling pathogen sporulation was not significantly reduced. *C. rosea* established efficiently on rose debris, as verified by the increment of the antagonist sporulation at each evaluation, the high values of area under sporulation curve, and the crescent reduction on *B. cinerea* sporulation. However, the incidence of gray mould was not significantly reduced, probably due to three main reasons: the applications of *C. rosea* started by the end of January, when gray mould epidemic was advanced; no sanitation practices were performed during the experiment; and the production of *B. cinerea* spores on border plants (untreated) in the greenhouse. The daily maximum relative humidity was the main factor that stimulated the debris colonization by both fungi, probably by its influence on the humidity content of the debris. The daily minimal relative humidity and maximum temperature, probably because of their association to the debris dryness, reduced the growth of both fungi. The find that the environmental requirements for *C. rosea* and *B. cinerea* are similar can be of paramount importance to establish a biocontrol strategy against the pathogen.

From the present and previous studies, the continuous applications of *C. rosea* can be expected to markedly reduce inoculum production by *B. cinerea* and, consequently, gray mould incidence in rose production systems, regardless the favorable conditions for the pathogen in the greenhouse.

## INTRODUÇÃO GERAL

Como um fungo ubíquo e polífago, *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. acarreta severos danos a uma ampla gama de plantas cultivadas de importância econômica, principalmente em cultivos protegidos. Nos últimos anos, com o aumento do cultivo protegido no Brasil, o mofo cinzento tem sido um sério problema fitossanitário para diversas culturas, tais como roseira, morangueiro, tomateiro, crisântemo, eucalipto, dentre outras.

A existência de diferentes estratégias de sobrevivência e infecção, associada à grande variabilidade genética, tornam *B. cinerea* um patógeno de difícil controle. Apesar de os fungicidas ainda serem extensivamente usados no controle do patógeno, há necessidade de se integrarem outras práticas, para reduzir alguns dos problemas causados pelo uso excessivo destes produtos, tais como o aumento do custo de produção, o crescimento da poluição ambiental, a maior pressão de seleção na população do patógeno com predominância de isolados resistentes a fungicidas e a exposição dos aplicadores que trabalham no ambiente fechado de casas de vegetação, onde são expostos constantemente a altas concentrações de fungicidas.

Em face da dificuldade de controle do patógeno, a integração de tratamentos químicos com sistemas de manejo cultural e com agentes de biocontrole é a estratégia mais realista e racional para o manejo do mofo cinzento. Portanto, é importante considerarem-se duas premissas: i-é necessário se adotar o manejo integrado e ii-neste contexto, o controle biológico é fundamental, por ser este uma alternativa satisfatória do ponto de vista ambiental para suplementar ou substituir o controle químico.

Em 1995, iniciaram-se os estudos com controle biológico de *B. cinerea* em roseiras (*Rosa hybrida* L.) na UFV. A primeira etapa do trabalho foi a seleção de microrganismos com potencial para o controle do patógeno em botões e restos culturais de roseira. O fungo *Clonostachys rosea* (Link: Fr.) Schroers, Samuels, Siefert and W. Gams inibiu completamente a esporulação do patógeno em restos culturais de roseira e foi o mais efetivo entre 52 organismos avaliados, incluindo fungos filamentosos, bactérias e leveduras (Tatagiba et al., 1998). Apesar de *C. rosea* ter suprimido o patógeno em mais de 90% em pétalas destacadas, nenhum dos organismos investigados foi capaz de suprimir os sintomas em flores em mais que 50-65%, o que demonstra que a estratégia baseada na proteção direta de flores contra a

infecção não é suficiente para promover o controle satisfatório da doença. A partir destes resultados, estabeleceu-se uma nova estratégia para continuidade dos estudos: em vista da grande habilidade de *C. rosea* em suprimir o patógeno em restos culturais de roseira, o agente pode ser efetivamente empregado no controle da doença, visando reduzir a densidade de inóculo do patógeno.

Nos anos seguintes, vários aspectos da ecologia de *C. rosea* e das interações do antagonista com *B. cinerea* foram investigados em restos culturais de roseira (Morandi, 1997, Morandi et al. 2001). Nestes estudos, investigaram-se os efeitos da temperatura, do molhamento foliar, da concentração de esporos e de fungicidas sobre o crescimento de *C. rosea*, e avaliaram-se substratos para a produção massal de esporos do antagonista. Verificou-se que *C. rosea* é capaz de sobreviver pelo menos por um mês em folhas de roseira em temperaturas entre 10 e 30 °C. O estabelecimento do fungo foi pouco afetado pela ausência de período prolongado de molhamento foliar após sua aplicação. A eficiência de colonização de *C. rosea* em folhas de roseira foi proporcional à concentração de esporos utilizada, obtendo-se melhores resultados com concentrações na faixa de  $10^5$  a  $10^7$  conídios/ml. O crescimento micelial do antagonista foi favorecido por temperaturas entre 18 e 28 °C, com máximo em torno de 25 °C. Os fungicidas vinclozolin e diclofuanid inibiram quase completamente o crescimento micelial de *C. rosea*. Entretanto, mancozeb teve apenas pequeno efeito inibitório sobre o fungo, indicando a possibilidade de aplicações conjuntas do antagonista com este fungicida. A facilidade de obtenção de inóculo e a não exigência de equipamentos sofisticados podem viabilizar economicamente a produção massal de conídios de *C. rosea* em diversos substratos, como grãos de trigo, arroz com casca, arroz integral e folhas de roseira, nas quais se obtiveram esporulações superiores a  $4 \times 10^8$  esporos por grama de substrato. Investigaram-se, também, os possíveis mecanismos de antagonismo envolvidos na interação *C. rosea*-*B. cinerea*. Em discos de folhas de roseira, *C. rosea* inibiu totalmente o crescimento e a esporulação de *B. cinerea*, independentemente de o antagonista ter sido aplicado 24 h antes, ao mesmo tempo ou 24 h após o patógeno. Verificou-se, ainda, que *C. rosea* foi capaz de parasitar *B. cinerea* e de reduzir a esporulação do patógeno, quando este já estava estabelecido em restos de folhas.

Com base neste conjunto de conhecimentos adquiridos sobre a ecologia de *C. rosea* e seus mecanismos de interação e controle de *B. cinerea*, novas questões, agora de caráter mais aplicado, surgiram:

1. O antagonista é capaz de se estabelecer endofiticamente nos tecidos de roseira e, com isso ser mais competitivo com o crescimento saprofítico do patógeno quando da senescência dos tecidos?
2. O antagonista é capaz de competir eficientemente com os microrganismos indígenas e se estabelecer nos restos culturais de roseira em condições naturais?
3. O antagonista é capaz de colonizar ferimentos provocados por pragas, podas, colheitas ou outros tratamentos culturais de forma a limitar estas portas de entrada do patógeno?
4. O antagonista é eficiente na redução da esporulação de *B. cinerea* sob condições de cultivo comercial de rosas em casa de vegetação?

Para responder estas perguntas, delineou-se este estudo, cujas hipóteses de trabalho foram:

1. *C. rosea* é capaz de colonizar endofiticamente, sem causar sintomas, diferentes tecidos de roseira, em diferentes estádios de desenvolvimento;
2. *C. rosea* possui habilidade saprofítica suficiente para se estabelecer na comunidade microbiana dos restos culturais de roseira;
3. *C. rosea* pode colonizar ferimentos eficientemente nos tecidos de roseira, de modo a limitar a colonização do patógeno;
4. *C. rosea* é eficiente na redução da produção de inóculo de *B. cinerea* em condições de cultivo protegido.

A tese está dividida em quatro capítulos. O primeiro é uma **revisão de literatura**, que enfoca a necessidade do manejo integrado de *Botrytis cinerea* e ressalta a importância do controle biológico neste contexto. Os outros três capítulos correspondem aos trabalhos de pesquisa propriamente dito, onde se procurou explorar as hipóteses delineadas acima. Assim, os capítulos são:

**Capítulo 1** – Manejo integrado de doenças causadas por *Botrytis cinerea*.

**Capítulo 2** – Efeito de fatores do hospedeiro e da microbiota epífita e endofítica no desenvolvimento de *Clonostachys rosea* e no controle de *Botrytis cinerea* em roseiras.

**Capítulo 3** – Relação de infestações de ácaros e afídeos com o controle de *Botrytis cinerea* por *Clonostachys rosea* em folhas de roseira.

**Capítulo 4** – Redução da esporulação de *Botrytis cinerea* por *Clonostachys rosea* em restos culturais como componente do manejo do mofo cinzento em roseiras.

## CAPÍTULO 1

### **Manejo integrado de doenças causadas por *Botrytis cinerea*.**

Morandi, M.A.B., Maffia, L.A. 1999. Manejo integrado de doenças causadas por *Botrytis cinerea* *In*: Zambolim, L. (Ed.) **Manejo Integrado de Doenças e Pragas – 1º Encontro**, p.53-68, Imprensa Universitária, Universidade Federal de Viçosa.

# MANEJO INTEGRADO DE DOENÇAS CAUSADAS POR *BOTRYTIS CINEREA*

## 1. INTRODUÇÃO

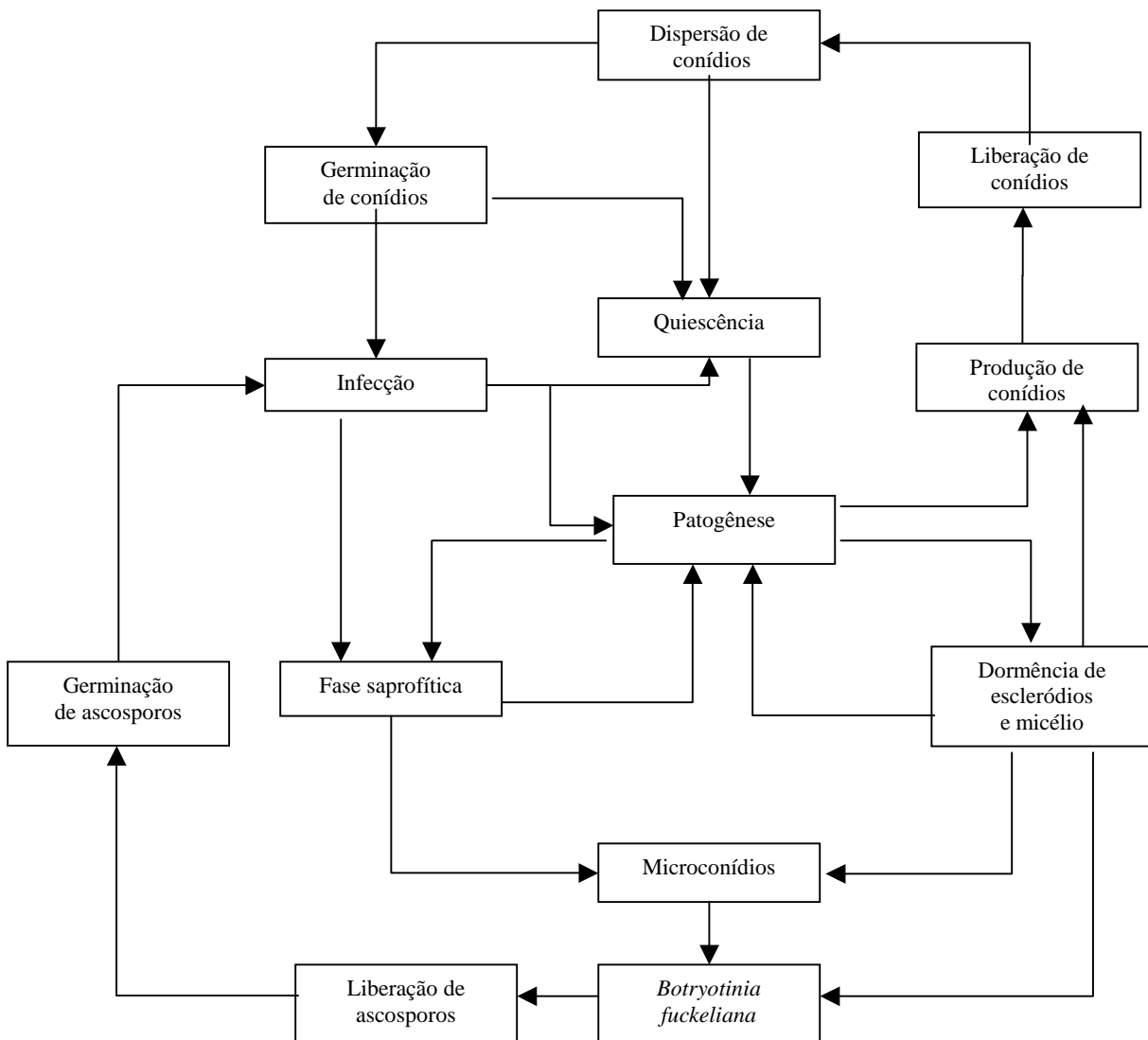
O fungo *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. está amplamente distribuído no mundo e pode infectar mais de 200 gêneros diferentes de plantas (JARVIS, 1980). O patógeno pode causar perdas consideráveis em plantas ornamentais, hortícolas, frutíferas, cereais e essências florestais, em condições de sementeira, viveiro, campo, casa de vegetação, bem como durante o armazenamento e transporte de produtos vegetais. Em vista da ampla gama de hospedeiros, ampla faixa geográfica de ocorrência e potencial para desenvolvimento de epidemias severas e rápidas, *B. cinerea* é um dos fitopatógenos mais importantes e um dos mais difíceis de se controlar.

O patógeno é de grande importância em “culturas protegidas”. Assim, as discussões a seguir serão direcionadas ao manejo de *B. cinerea* em casa de vegetação. Entretanto, alguns princípios podem ser extrapolados para seu manejo em outras condições culturais.

O controle racional requer o conhecimento da etiologia e epidemiologia de doenças e das relações do patógeno com outros microrganismos, sob a influência dos fatores ambientais. A seguir, discutir-se-ão aspectos resumidos da etiologia e epidemiologia da doença, seguida das principais estratégias para o seu manejo.

## 2. ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA

A forma perfeita de *Botrytis cinerea* é o ascomiceto *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel. Como nas condições brasileiras prevalece a forma imperfeita do fungo, nas referências posteriores ao patógeno, utilizar-se-á o binômio *Botrytis cinerea*. O ciclo de vida do patógeno é bastante complexo, com diversas fases entrelaçadas (Fig. 1). Fatores do hospedeiro (resistência, hábito de crescimento) e do ambiente (água livre, umidade relativa, temperatura, luz) afetam a ocorrência e, ou, prevalência de uma ou mais fases. O manejo das doenças causadas por este patógeno requer a interrupção do maior número possível de pontos em seu ciclo de vida, bem como do conhecimento dos efeitos do ambiente e do hospedeiro sobre ele (JARVIS, 1992).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Botryotinia fuckeliana* (anamorfo *Botrytis cinerea*). Adaptado de JARVIS (1992).

*Botrytis cinerea* é patógeno necrotrófico, que esporula em tecidos mortos ou em restos culturais na superfície do solo. A produção de conídios se dá em temperaturas acima de 12°C (ideal entre 15 e 20°C) em condições de alta umidade relativa (>90%). A liberação dos esporos é governada por um mecanismo higroscópico e ocorre quando há rápida mudança na umidade relativa, principalmente nas horas mais quentes do dia. A germinação dos conídios é favorecida por temperaturas amenas, em torno de 20°C. Entretanto, o crescimento do tubo germinativo é mais rápido a 30°C (JARVIS, 1989).

A temperatura ótima para infecção depende, em parte, das reações de defesa do hospedeiro, mas, na maioria dos casos, ocorre entre 15 e 25°C. *Botrytis cinerea* pode também produzir infecções quiescentes. Nessas, após penetrar, o patógeno paralisa seu crescimento até que as condições ambientais ou do tecido hospedeiro (por exemplo, a senescência dos tecidos) se tornem conducivas. Em hastes de tomateiro, infecções por *B. cinerea* podem permanecer quiescentes por até 12 semanas (JARVIS, 1989). Em rosas de corte, infecções quiescentes nos botões, não detectadas no momento da colheita, desenvolvem-se rapidamente sob condições de alta umidade relativa durante o armazenamento e transporte, mesmo sob baixa temperatura (2 a 5°C) (VOLPIN e ELAD, 1991). Sob condições ótimas, aproximadamente 19°C e umidade relativa maior que 95%, o ciclo da doença pode se completar em menos que 7 dias (MAROIS, 1996).

ARAÚJO (1995) realizou estudos epidemiológicos com o mofo cinzento da roseira, causado por *B. cinerea*. No seu trabalho, estudou a sobrevivência de *B. cinerea*, na forma de escleródios no solo e de micélio entre restos de cultura. O patógeno sobreviveu, como escleródios, por um período de 12 meses. Como micélio, sobreviveu mais sobre pétalas, onde esporulou até os 12 meses, que sobre hastes e folhas. Ocorreu grande produção de escleródios sobre pétalas. Estudou, também, a germinação de conídios, o crescimento micelial, a esporulação e a produção de escleródios de *B. cinerea*. Maiores percentuais de germinação, crescimento micelial e esporulação ocorreram a 20°C, enquanto a maior produção de escleródios foi a 15°C. As temperaturas extremas (5 e 30°C) foram desfavoráveis ao patógeno. Avaliou o efeito da temperatura (10, 15, 20 e 25°C) e do período de molhamento de pétalas (8, 16, 24 e 32 h) sobre a infecção de botões por *B. cinerea*. A severidade máxima ocorreu a 20°C, com 24 horas de molhamento.

### 3. PRINCÍPIOS DE MANEJO DAS DOENÇAS CAUSADAS POR *BOTRYTIS*

Como nas demais doenças, a ocorrência e intensidade do mofo cinzento estão associadas à atuação conjunta de fatores do ambiente, do hospedeiro e do patógeno. O homem, ao modificar as condições do ambiente, do hospedeiro e do patógeno, completa o denominado tetraedro de doença.

Assim, é necessário integrar várias medidas de controle para que se reduzam as perdas causadas pelo patógeno (GULLINO, 1992; ARAÚJO, 1995). Entre essas, incluem-se práticas de saneamento; alteração do ambiente (temperatura e umidade relativa); uso de fungicidas; aplicação de substâncias em pré e pós-colheita e o controle biológico (HAMMER e MAROIS, 1988; ELAD e VOLPIN, 1991; GULLINO, 1992; JARVIS, 1992; HAUSBECK e MOORMAN, 1996).

#### **Práticas de saneamento**

As principais fontes de inóculo para *B. cinerea* são os restos culturais infectados (ARAÚJO, 1995). A quantidade de restos infectados no interior das casas de vegetação pode afetar a concentração de inóculo no ar, pois, sob condições favoráveis, o patógeno esporula rápida e abundantemente nesses tecidos: o fungo pode produzir em torno de  $10^4$  conídios/cm<sup>2</sup> de folhas de gerânio (HAUSBECK e MOORMAN, 1996) e  $10^5$  a  $10^7$  conídios/cm<sup>2</sup> de folhas de morangueiro (SOSA-ALVAREZ et al., 1995). Já se observou correlação entre a quantidade de tecidos senescentes com a esporulação de *B. cinerea* e a concentração de inóculo do patógeno no ar e a incidência da doença (HAUSBECK e PENNYPACKER, 1991 e KERSSIES, 1993).

Espera-se que a remoção de tecidos senescentes colonizados pelo patógeno reduzam a incidência da doença. MONTEIRO (1996) comparou o progresso do mofo cinzento da roseira em casas de vegetação, com e sem eliminação de restos culturais. Em duas épocas, ocorreu decréscimo gradual na incidência da doença quando os restos culturais foram eliminados. Se essa prática continuasse a ser implementada, esperar-se-ia redução da intensidade da doença a níveis ainda mais inferiores.

Entretanto, as práticas de saneamento são insuficientes para controlar *B. cinerea*, se tomadas isoladamente, pois o patógeno pode dispersar e multiplicar rapidamente, por meio de repetidos ciclos de esporulação (PLAUT e BERGER, 1981).

### **Controle do ambiente**

A presença de grande quantidade de inóculo assegurará infecção por *B. cinerea*, se as condições ambientais estiverem favoráveis ao patógeno (KERSSIES, 1994). Alta umidade relativa (>90%) e presença de água livre, pré-requisitos à infecção, são comuns na maioria das casas de vegetação. O aumento da circulação de ar nessas casas impede que o filme de água sobre as pétalas permaneça tempo suficiente para ocorrer infecção (JARVIS, 1992).

Em vasos com *Exacum affine*, arranjados em fileiras paralelas ao fluxo de ar e com espaço entre as fileiras, ocorreu ambiente menos favorável à germinação, infecção e esporulação de *B. cinerea* (TROLINGER e STRIDER, 1984). Aumentando-se o espaçamento entre plantas, tem-se um dossel menos denso, o que permite melhor penetração da luz. Conseqüentemente, há redução da senescência precoce das folhas mais baixas e redução dos sítios favoráveis à infecção do patógeno.

Durante a propagação de plantas, o ambiente úmido otimiza o enraizamento, mas a podridão das estacas e a queima das folhas provocadas por *B. cinerea* freqüentemente ocorrem (HAUSBECK e MOORMAN, 1996). Para minimizar esses problemas, podem-se tomar alguns cuidados com as estacas, como o agrupamento por idade, para evitar que as mais velhas permaneçam molhadas por tempo excessivo e a separação das recém-plantadas das mais velhas e de plantas já estabelecidas, as quais podem ser fontes de inóculo.

Reduziu-se a intensidade do mofo cinzento em tomateiros em casas de vegetação cobertas com um tipo especial de polietileno, o qual absorve radiação infravermelha (IV) de comprimento de onda longo. A absorção do IV reduz a umidade relativa no interior da casa de vegetação, pois reduz o resfriamento durante a noite (VAKALOUNAKIS, 1992).

Normalmente, a temperatura em casas de vegetação não é limitante a *B. cinerea*. Em roseira, o patógeno pode se desenvolver em faixa ampla de temperatura (ELAD, 1989; ARAÚJO, 1995). Conídios podem germinar em pétalas de gerbera, de 4 a 25°C (SALINAS et al., 1989). Outros efeitos da temperatura podem ser explorados para o manejo de *B. cinerea*. O tratamento térmico de botões de rosa, por imersão em água a 50°C por 20-40 segundos, controlou o patógeno em pós-colheita (ELAD e VOLPIN, 1991). Pode-se usar a solarização, para erradicar o fungo do solo e restos de cultura em casas de vegetação (LÓPEZ-HERRERA et al., 1994).

### Uso de fungicidas

Os fungicidas são utilizados intensivamente em programas de manejo de *B. cinerea*. Entretanto, o controle químico não deve excluir as práticas de saneamento ou de controle de ambiente, pois quando a intensidade da doença é alta, os fungicidas podem ser ineficientes (MONTEIRO, 1996; HAUSBECK e MOORMAN, 1996). O controle químico de *B. cinerea* é dificultado pela habilidade de o patógeno em infectar praticamente todas as partes da planta, na maioria dos estádios de crescimento.

Problema sério no controle químico é a resistência do patógeno a fungicidas, que pode se desenvolver dentro de uma estação de cultivo, mesmo com o uso de misturas de princípios ativos (NORTHOVER e MATTEONI, 1986). O aparecimento de isolados resistentes resulta, provavelmente, da pressão de seleção imposta à população do patógeno pelo uso exclusivo e extensivo de certos fungicidas, sob condições favoráveis à epidemia do mofo cinzento (KATAN, 1982). Dois grupos de fungicidas de ação específica, benzimidazoles e dicarboximidas, são mais utilizados no controle de *B. cinerea*. Inicialmente, os benzimidazoles tinham alta eficiência de controle e foram usados indiscriminadamente. Porém, perderam sua importância na última década, em virtude do aparecimento rápido e da persistência de isolados resistentes (GULLINO, 1992). A resistência a esse grupo de fungicidas pode ser bastante duradoura: população de *B. cinerea* resistente a benzimidazoles foi detectada em casa de vegetação, onde o produto deixou de ser utilizado por 12 anos (FARETRA et al., 1989). Os produtos a base de dicarboximidas substituíram os benzimidazoles em muitas situações. Porém, sua alta efetividade inicial foi perdida, em parte com o desenvolvimento de populações resistentes. Apesar da resistência às dicarboximidas se desenvolver mais lentamente que aos benzimidazoles, atualmente já está amplamente disseminada (GULLINO, 1992).

Para evitar o desenvolvimento da resistência, vários autores sugerem o uso de fungicidas de modos de ação diferentes, alternadamente ou em mistura (BARAK e EDGINGTON, 1984a,b; ELAD, 1992; GULLINO, 1992; MOORMAN e LEASE, 1992; HAUSBECK e MOORMAN, 1996). A alternância dos benzimidazoles com fungicidas de ação não específica não previne o aumento das populações resistentes, pois o pequeno período de tempo entre as pulverizações é insuficiente para o declínio das populações resistentes. O uso de misturas de fungicidas com diferentes modos de

ação também não é efetivo no manejo de populações resistentes, se na mistura houver um fungicida ao qual o patógeno é resistente (VALI e MOORMAN, 1992).

Apesar de menos eficientes que os específicos, os fungicidas de ação não específica são importantes no manejo da doença, pois têm amplo espectro de ação e complementam os fungicidas específicos em estratégias anti-resistência (GULLINO, 1992). Porém, na Europa e Canadá, já há relatos de populações de *B. cinerea* resistentes a alguns desses produtos, como chlorotalonil, dichlofluanida e thiram (BARAK e EDGINGTON, 1984b). Fungicidas inibidores da síntese de esterol, como tebuconazol e fenethanil, controlam efetivamente *B. cinerea*, mas já há registros de resistência a esses produtos, em locais onde foram mal utilizados ou utilizados em subdosagens (ELAD, 1992).

O efeito de aditivos misturados aos fungicidas precisa ser mais explorado. Observou-se efeito sinérgico com a mistura de óleo parafínico a fungicidas: o controle de isolados resistentes a benzimidazoles e dicarboximidas com os dois fungicidas isoladamente foi inferior a 10% e o com o óleo sozinho foi de cerca de 50%. Entretanto, com a combinação do óleo com cada um dos fungicidas, o controle foi de 88 a 100% (BOURBOS et al., 1994).

### **Aplicação de substâncias em pré e pós-colheita**

Em floricultura, para aumentar a longevidade e a qualidade de flores, bem como controlar patógenos que as atacam, podem-se usar substâncias como ácido cítrico (HALEVY et al., 1978), ácido salicílico (GAUR e CHENULU, 1982), sacarose (HALEVY et al., 1978), tiosulfato de prata (TSP) (SEREK et al., 1994) e sulfato de cálcio (CONWAY et al., 1994; ELAD e KIRSHNER, 1992). Tais substâncias são utilizadas em pulverizações foliares, em pré-colheita, ou em solução de acondicionamento, em pós-colheita. Cada uma das substâncias citadas possui um mecanismo específico de ação. Algumas agem sobre o patógeno, outras sobre o metabolismo do hospedeiro e outras sobre ambos (ABELES et al., 1992; CONWAY et al., 1994; ELAD e KIRSHNER, 1992; VOLPIN e ELAD, 1991). Tratamentos de botões de rosa com inibidores da síntese e ação de etileno foram testados: tiosulfato de prata, em imersão, e ácido aminooxiacético, em pulverização, reduziram significativamente a incidência da doença durante subsequente incubação a 10 e 20°C (ELAD, 1988).

CAPDEVILLE (1996) avaliou o efeito da pulverização em pré-colheita de sulfato de cálcio e da imersão das hastas, em soluções dos ácidos cítrico e salicílico, da sacarose, do sulfato de cálcio e do tiosulfato de prata na severidade do mofo cinzento e na vida de vaso de flores de rosa (VV). A pulverização com sulfato de cálcio reduziu a severidade da doença e aumentou a VV. O tratamento mais efetivo em pós-colheita foi o sulfato de cálcio. Esse, a 50 mM, reduziu a severidade da doença e prolongou a VV. Portanto, acredita-se que a aplicação de sulfato de cálcio, em pré ou pós-colheita, é alternativa potencialmente eficaz no manejo do mofo cinzento.

### **Controle biológico**

O controle biológico é alternativa viável dentro de um programa de manejo integrado de *B. cinerea*. Atualmente, existe ampla gama de antagonistas para biocontrole, incluindo-se fungos filamentosos (*Trichoderma harzianum* Rifai, *Clonostachys rosea* (Link: Fr.) Schorers, Samuels, Siefert e W.Gams, *Cladosporium* spp., *Ulocladium atrum* Preuss), leveduras (*Exophiala jeanselmei* (Langeron) Mc Ginnis e Paohye, *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner; e bactérias (*Pseudomonas cepacia* Bulkholder, *Bacillus subtilis* Cohn, *Erwinia* sp.).

Consideráveis avanços têm ocorrido no uso do controle biológico, pelo aumento da população de microrganismos nativos e pela introdução de antagonistas específicos (NIGAM e MUKERJI, 1986). Os microrganismos saprófitas habitantes da superfície das plantas produzem metabolitos tóxicos, consomem exsudados e, ou, impedem o desenvolvimento dos patógenos por competição ou micoparasitismo. A competição é um dos principais métodos de controle de patógenos, os quais, como *B. cinerea*, necessitam de fonte externa de açúcares para infectarem o hospedeiro (BLAKEMAN, 1985; TOKESHI, 1991; ELAD, 1996).

O controle biológico de *Botrytis* spp. tem buscado proteger folhas verdes da infecção pelo patógeno (DUBOS, 1992). Porém, como o tempo de interação do patógeno e o antagonista no filoplano é curto, o esporo do patógeno pode germinar, o tubo germinativo penetrar rapidamente nos tecidos e escapar do antagonista (FOKKEMA, 1993). Assim, a estratégia de controle que se baseia na competição de um antagonista saprófita com o crescimento saprofítico de *Botrytis* spp. pode reduzir o crescimento e a esporulação do patógeno em restos culturais (KÖHL et al., 1995), e

resultará na redução da taxa de progresso da doença. Uma vantagem adicional desta estratégia é o longo tempo de interação entre o patógeno e o antagonista nos restos culturais. Já se demonstrou que a supressão da colonização e da esporulação do patógeno são estratégias válidas de controle biológico (KÖHL e FOKKEMA, 1994; SUTTON e PENG, 1993; MORANDI, 1997; MORANDI et al., 2001).

*Clonostachys rosea* passou a ser considerado como antagonista potencial a *B. cinerea* no final da década de 80, em estudos do biocontrole do mofo cinzento em morangueiro (PENG e SUTTON, 1990). Consistentemente, isolados do antagonista suprimiram o patógeno em mais de 98% em ensaios com folhas, pétalas e estames de morangueiro, com eficiência igual ou superior a captan, fungicida padrão no controle da doença (PENG e SUTTON, 1991). O antagonista foi eficiente no controle do patógeno em outros hospedeiros, como gerânio, begônia, ciclamen, *Exacum affine*, tomateiro, pimentão, pepino, framboesa e em mudas de abeto preto e outras coníferas (SUTTON et al., 1997). Um isolado de *C. rosea* propiciou reduções de até 100% na esporulação de *B. cinerea* em restos culturais de roseira (TATAGIBA et al., 1998).

*Clonostachys rosea* estabeleceu em folhas verdes, senescentes ou mortas de roseira e suprimiu a esporulação do patógeno em mais de 96% (MORANDI, 1997; MORANDI et al., 2001). Nesses estudos, verificou-se que *C. rosea* pode atuar no controle de *B. cinerea*, por colonizar o substrato antes e mais eficientemente que o patógeno, por micoparasitar hifas e conidióforos do patógeno e por reduzir significativamente sua esporulação.

#### **4. MANEJO INTEGRADO – UMA NECESSIDADE**

Como já relatado, *B. cinerea* é fitopatógeno de difícil controle. O fungo apresenta ampla gama de hospedeiros, é adaptado a diferentes condições climáticas e ecológicas, é saprófita eficiente e, sob condições favoráveis, esporula rápida e abundantemente. Ademais, como é patógeno necrotrófico, o uso de resistência é dificultada, e não se dispõem de variedades resistentes nas culturas mais importantes afetadas pela doença. Portanto, a integração de tratamento químico com um sistema de manejo cultural e agentes de biocontrole é o caminho mais realista e racional para o manejo das doenças causadas por *B. cinerea* (GULLINO, 1992).

Atualmente, com o acúmulo de conhecimentos epidemiológicos, já é possível o uso de sistemas de previsão de ocorrência no manejo de doenças. Nessa abordagem,

SHTIENBERG e ELAD (1997) desenvolveram um sistema para a integração do controle biológico e químico de *B. cinerea* em hortaliças cultivadas em casas-de-vegetação. No desenvolvimento, basearam-se em duas premissas básicas: i- o controle biológico pode reduzir a aplicação de fungicidas e ii- a germinação de esporos e a penetração do patógeno são as fases do ciclo de *B. cinerea* mais sensíveis à flutuação do ambiente. Assim, prevendo-se as condições de ambiente favoráveis à ocorrência dessas duas fases, pode-se prever a ocorrência de doença e racionalizar a implementação de estratégias de manejo, com a associação do controle biológico ao químico. O agente de biocontrole foi o fungo *Trichoderma harzianum*, formulado comercialmente como Trichodex. As decisões sobre a aplicação do agente de biocontrole ou fungicida basearam-se num sistema de previsão da doença. A estratégia BOTMAN (BOTtrytis MANagement) foi implementada em função de: i- quando o progresso da doença é lento ou não esperado, não se pulveriza; ii- quando o progresso rápido é esperado, recomenda-se o fungicida; iii- nas demais situações, recomenda-se a aplicação de Trichodex. Esse sistema foi testado em diferentes casas-de-vegetação em Israel, com bastante sucesso. Assim, com a integração de agentes químicos e biológicos de controle, pode-se reduzir o uso de produtos químicos e manejar mais efetivamente o desenvolvimento de populações do patógeno resistentes a fungicidas. Essa é uma meta a se atingir, tanto nas doenças causadas por *B. cinerea* quanto nas demais doenças de plantas.

## 5. REFERÊNCIAS

- ABELES, F.B., MORGAN, P.B., SALTVEIT, M.E. Ethylene in Plant Biology. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1992. 414 p.
- ARAÚJO, A. E. **Sobrevivência de *Botrytis cinerea* em restos de cultura, efeito de fatores de ambiente sobre o patógeno e progresso do mofo cinzento em roseiras cultivadas em casa de vegetação.** Viçosa, MG: UFV, 98p. Dissertação (MS Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1995.
- BARAK, E.; EDINGTON, L.V. *Botrytis cinerea* resistant to captan: the effect of inoculum age and type on response to fungicide. **Can. J. Plant Pathol.** 6: 221-224, 1984(a).
- BARAK, E.; EDINGTON, L.V. Cross-resistance of *Botrytis cinerea* to captan, thiram, clorothalonil and related fungicides. **Can. J. Plant Pathol.** 6: 318-320, 1984(b).

- BLAKEMAN, J. P. Ecological succession of leaf surface microorganisms in relation to biological control. In: WINDELS, C. E., LINDOW, S. E. **Biological control on the phylloplane**. St. Paul: APS Press, 1985. p. 6-30.
- BOURBOS, V.A.; SKOUDRIDAKIS, M.T.; HAITAS, V.X.; FOTIADIS, K.S. The possible control of *Botrytis cinerea* Pers. using parafinic oils. In: Proc. Brighton Crop Prot. Conf. Pest. Dis. p.794-800, 1994.
- CAPDEVILLE, G. **Controle de *Botrytis cinerea* em rosas por tratamentos pré e pós-colheita**. Viçosa, MG: UFV, 1996. 72p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- CONWAY, W.S., SAMS, C.E., WANG, C.Y. et alii. Additive effects of postharvest calcium and heat treatment on reducing decay and maintaining quality in apples. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, 119: 49-53, 1994.
- DUBOS, B. Biological control of *Botrytis*: state-of-the-art. In: VERHOEFF, K., MALATHRAKIS, N. E., WILLIAMSON, E. B. **Recent advances in *Botrytis* research**. Wageningen: PUDOC, 1992. p. 169-179.
- ELAD, Y. Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. **Eur. J. Pl. Pathol.** 102: 719-732, 1996.
- ELAD, Y. Reduced sensitivity of *Botrytis cinerea* to two sterol biosynthesis-inhibiting fungicides: Fenetrazole and Fenetranil. **Plant Pathol.** 41: 47-54, 1992.
- ELAD, Y. Effect of abiotic conditions on development of grey mould of rose and scanning electron microscopy. **Phytopatol. Medit.** 28: 122-130, 1989.
- ELAD, Y. Latent infection of *Botrytis cinerea* in rose flowers and combined chemical and physiological control of the disease. **Crop Protection** 7: 361-366, 1988.
- ELAD, Y., KIRSHNER, B. Calcium reduces *Botrytis cinerea* damages to plants of *Ruscus hypoglossum*. **Phytoparasitica**, 20: 285-291, 1992.
- ELAD, Y.; VOLPIN, H. Heat treatment for the control of Rose and Carnation grey mould (*Botrytis cinerea*). **Plant Pathol.** 40: 278-286, 1991.
- FARETRA, F.; POLLASTRO, S.; DiTONNO, A.P. New natural variants of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) coupling benzimidazole-resistance to insensitivity toward the *N*-phenylcarbamate dietofencarb. **Phytopathol. Mediterr.** 28: 98-104, 1989.
- FOKKEMA, N. J. Opportunities and problems of control of foliar pathogens with micro-organisms. **Pestic. Sci.** 37: 411-416, 1993.
- GAUR, A., CHENULU, V.V. Chemical control of postharvest disease of *Citrus reticulata* and *Solanum tuberosum*. **Indian Phytopath.** 35: 623-632, 1982.

- GULLINO, M. L. Chemical control of *Botrytis* spp. In: VERHOEFF, K., MALATHRAKIS, N. E., WILLIAMSON, E. B. **Recent advances in Botrytis research**. Wageningen: PUDOC, 1992. p. 217-222.
- HALEVY, A.H., BYRNE, T.G., KOFRANEK et alii. Evaluation of postharvest handling methods for transcontinental truck shipments of cut carnation, chrysanthemum and roses. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 103:151-155, 1978.
- HAMMER, P.E.; MAROIS, J.J. Postharvest control of *Botrytis cinerea* on cut roses with micro-cupric-ammonium formate. **Plant Dis.** 72: 347-350, 1988.
- HAUSBECK, M.K.; MOORMAN, G.W. Managing *Botrytis* in greenhouse-grown flower crops. **Plant Dis.** 80: 1212-1219, 1996.
- HAUSBECK, M.K.; PENNYPACKER, S.P. Influence of grower activity and disease incidence on concentrations of airborne conidia of *Botrytis cinerea* among geranium stock plants. **Plant Dis.** 75: 798-803, 1991.
- JARVIS, W. R. **Managing diseases in greenhouse crops**. Harrow: APS Press, 1992. 288p.
- JARVIS, W.R. Managing diseases in greenhouse crops. **Plant Dis.** 73: 190-194, 1989.
- JARVIS, W.R. Taxonomy. In: COLEY-SMITH, J.R.; VERHOEFF, K.; JARVIS, W.R (eds) **The biology of Botrytis**, Acad. Press, 1980, p 10-14.
- KATAN, T. Resistance to 3,5-dichlorophenyl-N-cyclicimide (dicarboximide) fungicides in the grey mould pathogen *Botrytis cinerea* on protected crops. **Plant Pathol.** 31: 133-141, 1982.
- KERSSIES, A. Effects of temperature, vapour pressure deficit and radiation on infectivity of conidia of *Botrytis cinerea* and on susceptibility of gerbera petals. **Eur. J. Pl. Pathol.** 100: 123-136, 1994.
- KERSSIES, A. Influence of environmental conditions on dispersal of *Botrytis cinerea* conidia and on post-harvest infection of gerbera flowers grown under glass. **Plant Pathol.** 42: 754-762, 1993.
- KÖHL, J.; FOKKEMA, N. J. Fungal interactions on living and necrotic leaves. In: BLAKEMAN, J. P., WILLIAMSON, B. (Eds.) **Ecology of plant pathogens**. Oxon: CABI, 1994. p.321-334.
- KÖHL, J.; MOLHOEK, W. M. L.; van der PLAS, C. H.; FOKKEMA, N. J. Suppression of sporulation of *Botrytis* spp. as a valid biocontrol strategy. **Eur. J. Plant Pathol.** 101: 251-259, 1995.
- LÓPEZ-HERRERA, C.J.; VERDÚ-VALIENTE, B.; MELERO-VARA, J.M. Erradication of primary inoculum of *Botrytis cinerea* by soil solarization. **Plant Dis.** 78: 594-597, 1994.

- MAROIS, J.J. Epidemiology of *Botrytis cinerea*. **XI International Botrytis Symposium. Book of abstracts.** Wageningen, 1996. p. 45.
- MONTEIRO, A. J. A. **Avaliação da remoção de restos culturais e de fungicidas na intensidade do mofo cinzento em roseiras cultivadas em casas de vegetação.** Viçosa, MG: UFV, 1996. 49p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- MOORMAN, G.W.; LEASE, R.J. Residual efficacy of fungicides used in the management of *Botrytis cinerea* on greenhouse-grown geraniums. **Plant Dis.** 76: 374-376, 1992.
- MORANDI, M.A.B. ***Gliocladium roseum* como agente de biocontrole de *Botrytis cinerea* em roseiras cultivadas em casa de vegetação.** Viçosa, MG: UFV, 1997. 60p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- MORANDI, M.A.B.; MAFFIA, L.A.; SUTTON, J.C. Development of *Clonostachys rosea* and interactions with *Botrytis cinerea* in rose leaves and residues. **Phytoparasitica** 29, 2001 (In Press).
- NIGAM, N.; MUKERJI, K. G. Biological control: concepts and practices. In: MUKERJI, K. G., GARG, K. L. **Biological control of plant diseases.** Boca Raton: CRC Press, 1986. v.1, p. 1-13.
- NORTHOVER, J.; MATTEONI, J.A. Resistance of *Botrytis cinerea* to Benomyl and Iprodione in vineyards and greenhouses after exposure to the fungicides alone or mixed with Captan. **Plant Dis.** 70: 398-402, 1986.
- PENG, G.; SUTTON, J. C. Biological methods to control grey mould of strawberry. In: **Proc. Brighton Crop Port. Conf. Pests Dis.**, v.3, p. 233-240 Br. Crop Prot. Council., Farnham, England, 1990.
- PENG, G.; SUTTON, J. C. Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. **Can. J. Plant Pathol.** 131: 247-257, 1991.
- PLAUT, J.L.; BERGER, R.D. Infection rates in three pathosystem epidemics initiated with reduced disease severities. **Phytopathology** 71: 917-921, 1981.
- SALINAS, J.; GLANDORF, D.C.M.; PICAUVET, F.D.; VERHOEFF, K. Effects of temperature, relative humidity, and age of conidia on the incidence of spotting on gerbera flowers by *Botrytis cinerea*. **Neth. J. Plant Pathol.** 95:51-64, 1989.
- SHTIENBERG, D; ELAD, Y. Incorporation of weather forecasting in integrated, biological-chemical management of *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**, 87: 332-340. 1997.
- SEREK, M., JONES, R.B., REID, M.S. Role of ethylene in opening and senescence of *Gladiolus* sp. flowers. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, 119: 1014-1019, 1994.

- SOSA-ALVAREZ, M.; MADDEN, L.V.; ELLIS, M.A. Effects of temperature and wetness duration on sporulation of *Botrytis cinerea* on strawberry leaf residues. **Plant Dis.** 79: 609-615, 1995.
- SUTTON, J.C.; LI, de-W.; PENG, G.; YU, H.; ZHANG, P.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. *Gliocladium roseum*: a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. **Plant Dis.** 81: 316-328, 1997.
- SUTTON, J. C.; PENG, G. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. **Phytopathology** 83: 615-621, 1993.
- TATAGIBA, J.S.; MAFFIA, L.A.; BARRETO, R.W.; ALFENAS, A.C.; SUTTON, J.C. Biological control of *Botrytis cinerea* in residues and flowers of rose (*Rosa hybrida*). **Phytoparasitica** 26:8-19, 1998.
- TOKESHI, H. Manejo da microflora epífita no controle de doenças de plantas. In: **Anais da IV Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas** Campinas, SP, p. 32-62, 8-10/10/1991.
- TROLINGER, J.C.; STRIDER, D.L. *Botrytis* blight of *Exacum affine* and its control. **Phytopathology** 74: 1181-1188, 1984.
- VAKALOUNAKIS, D.J. Control of fungal diseases of greenhouse tomato under long-wave infrared-absorbing plastic film. **Plant Dis.** 76: 43-46, 1992.
- VALI, R.J.; MOORMAN, G.W. Influence of selected fungicide regimes on frequency of dicarboximide-sensitive strains of *Botrytis cinerea*. **Phytopathology** 76: 919-924, 1992.
- VOLPIN, H.; ELAD, Y. Influence of calcium nutrition on susceptibility of rose flowers to botrytis blight. **Phytopathology** 81: 1390-1394, 1991.

## Capítulo 2

**Efeito de fatores do hospedeiro e da microbiota epífita e endofítica no desenvolvimento de *Clonostachys rosea* e no controle de *Botrytis cinerea* em roseiras.**

Morandi, M.A.B., Sutton, J.C., Maffia, L.A. 2000. Effects of host and microbial factors on development of *Clonostachys rosea* and control of *Botrytis cinerea* in rose. **European Journal of Plant Pathology**, 106: 439-448.

# Effects of host and microbial factors on development of *Clonostachys rosea* and control of *Botrytis cinerea* in rose

Marcelo A.B. Morandi<sup>1</sup>, John C. Sutton<sup>1\*</sup>, and Luiz A. Maffia<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Environmental Biology, University of Guelph, Guelph, Ontario, N1G 2W1,

<sup>2</sup>Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000 Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

\*Author for correspondence (Fax: +1-519-837-0442; E-mail: jsutton@evhort.uoguelph.ca.)

Accepted 24 February 2000

**Key Words:** Biological control, *Botrytis cinerea*, *Clonostachys rosea*, *Gliocladium roseum*, rose, host development, wounds, host residues, microflora

## Abstract

Development of *Clonostachys rosea* in rose leaves and petals and control of *Botrytis cinerea* by the agent were investigated. *C. rosea* germinated, established endophytic growth, and sporulated abundantly whether the tissues were mature, senescent, or dead when inoculated. Germination incidence was moderate on mature and senescent leaves (47% and 35%) and petals (31% and 43%), and high (>98%) on dead tissues. Sporulation of *C. rosea* in tissues inoculated when mature, senescent, or dead averaged 41%, 61%, and 75% in leaves, and 48%, 87% and 53% in petals. When leaves were wounded with needles before inoculation, germination of *C. rosea* increased from 45-56% to 90-92%, but sporulation became high (>75%) regardless of wounds. When leaves were inoculated with *C. rosea* at 0 to 24 h after wounding and subsequently with *B. cinerea*, germination of the pathogen was reduced by 25 to 41% and sporulation by  $\geq 99\%$ . A humid period prior to inoculation of senescent or dead leaves promoted communities of indigenous fungi, reduced sporulation of *C. rosea* and *B. cinerea*, and, in dead leaves, increased control of the pathogen associated with *C. rosea*. Applied at high density, isolates of indigenous *Penicillium* sp. and *Alternaria alternata* from rose interacted with *C. rosea* and reduced control of the pathogen by 16% and 21%, respectively. In conclusion, *C. rosea* markedly suppressed sporulation of *B. cinerea* in rose leaves and petals regardless of developmental stage, minor wounds, and natural densities of microflora. This versatility should allow *C. rosea* to effectively control inoculum production of *B. cinerea* in rose production systems.

## Introduction

*Botrytis cinerea* Pers.: Fr. is a destructive pathogen of hybrid roses (*Rosa hybrida* L.) grown as cut flowers in greenhouses in Canada, Brazil, and other countries (Horst, 1983; Elad, 1988; Hammer and Evensen, 1994; Tatagiba et al., 1998). Flecks, spots, and blighting produced by *B. cinerea* in the petals are important factors contributing to economic losses in roses. However, the pathogen also causes stem cankers and can produce lesions on the leaves and vegetative buds (Horst, 1983). Sanitation, cultural practices, microclimate regulation, fungicide sprays and treatment of the flowers with antioxidants, growth regulators, or warm water are measures used against *B. cinerea* in rose production systems (Horst, 1983; Elad, 1988; Hammer and Marois, 1989; Elad and Volpin, 1991; Elad et al., 1993; Elad and Evensen, 1995; Hausbeck and Moorman, 1996). Some rose cultivars are moderately resistant to the pathogen (Hammer and Evensen, 1994). Nonetheless, practical control of *B. cinerea* in

roses when in the greenhouse or in postharvest storage or transit often fails to meet industry requirements. Chemical fungicides, though widely employed, are in many instances under use restrictions or have declined in effectiveness because of increased insensitivity of the pathogen (Jarvis, 1992; Hausbeck and Moorman, 1996). In attempts to improve disease control, several investigators have explored use of microbial agents (Redmond et al., 1987; Hammer and Marois, 1989; Elad et al., 1993; Tatagiba et al., 1998).

One of the agents with superior performance against *B. cinerea* is a fungus long known as *Gliocladium roseum* Bainier (Sutton et al., 1997), but which was reclassified recently as *Clonostachys rosea* (Link: Fr.) Schroers, Samuels, Siefert and W. Gams [teleomorph, *Bionectria ochroleuca* (Schw.) Schroers and Samuels] (Schroers et al., 1999). In a recent study in Brazil, *C. rosea* completely blocked sporulation of the pathogen in rose leaf residues and was the most effective among fifty-two diverse microbes evaluated (Tatagiba et al., 1998). *C. rosea* was among a few microbes that

suppressed the pathogen by more than 90% in detached rose petals. None of the microbes investigated, or those reported in other studies (Redmond et al., 1987; Elad et al., 1993), suppressed symptoms in rose flowers by more than 50 to 65%, so are unlikely to be commercially acceptable for direct protection of the flowers. However, because *C. rosea* strongly suppresses inoculum production of *B. cinerea* in residues of rose and other crops, it might be feasible to employ the agent to protect rose flowers by reducing inoculum density of the pathogen.

The chief inoculum sources of *B. cinerea* in greenhouses are dead foliage and petals of rose which accumulate on the soil or greenhouse floor. In Brazil, the pathogen was able to sporulate for at least 8 months in leaf residues and for a year in petal residues placed on the surface of rose beds in commercial greenhouses (E. de A. Araújo, 1995, personal communication). An important strategy to reduce sporulation potential of *B. cinerea* in residues is to control infection and colonization of the foliage and flowers by the pathogen. Besides infecting nonwounded foliage and flowers, *B. cinerea* often infects tissues wounded by pruning, flower harvesting, and other production practices (Horst, 1983; Jarvis, 1992; M.A.B. Morandi, unpublished observations). Infections arising from conidia in most instances are initially quiescent, but become aggressive when the tissues senesce or are stressed. In contrast, infections initiated by mycelium in plant residues, such as dead petals adhering to healthy foliage, become aggressive immediately (Elad, 1988; Jarvis, 1992; Williamson, 1994). Sporulation of *B. cinerea* on colonized rose residues requires favorable temperature and humid periods (E. de A. Araújo, personal communication).

A nonpathogenic endophyte, *C. rosea* is able to suppress development and sporulation potential of *B. cinerea* in plant tissues through mechanisms such as hyperparasitism, nutrient competition and competitive colonization of senescing or dead tissues (Sutton et al., 1997; Yu and Sutton, 1997; Köhl and Fokkema, 1998). Effectiveness of the agent against the pathogen, however, is known to be influenced by host factors and host-associated microflora (Sutton, 1995; Sutton et al., 1997; Yu and Sutton, 1997). An understanding of the host and indigenous microflora in relation to the development of *C. rosea* and its ability to suppress *B. cinerea* is needed for development of rational programs to optimize the timing and targeting of *C. rosea* treatments. Accordingly, studies were conducted to determine the effects of the developmental stage of leaves and petals, tissue wounds, and host-associated microflora on germination,

growth, and sporulation of *C. rosea* on the host and the ability of the agent to reduce inoculum production by *B. cinerea* in leaf and petal residues.

## Materials and Methods

### *Rose plants.*

Plants of rose, cv. Sonia, were produced in 20-cm-diameter pots containing a soilless mix (Promix<sup>®</sup>, Plant Products Ltd., Brampton, Ontario, Canada) in a climate-controlled greenhouse. Average air temperatures in the greenhouse were 19 to 25°C during the day between 0800 and 2000 hours and 16 to 21°C during the night between 2000 and 0800 hours. White shades in the greenhouse roof were opened when irradiance was less than 800  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  and closed when it exceeded 1200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , and at night to reduce heat loss. Plants were supplied with soluble N:P:K (20:8:20) fertilizer (150 g l<sup>-1</sup> of water) once a week.

### *Inoculum production and inoculations.*

Isolate PG-88-710 of *C. rosea* (Peng and Sutton, 1991) and isolate MM-98-1 of *B. cinerea* from a flower of a greenhouse-grown rose were used for inoculations. Conidia of each fungus were produced on potato dextrose agar (PDA) medium under cool-white fluorescent lamps (12-h photoperiod) at 20 to 22°C. The conidia were suspended in sterile distilled water plus surfactant (0.05 ml Triton X-100/100 ml), filtered through three layers of cheesecloth and diluted to a desired density. For inoculations, the inoculum density of *C. rosea* was 10<sup>7</sup> conidia ml<sup>-1</sup> and that of *B. cinerea* was 10<sup>6</sup> conidia ml<sup>-1</sup>. Inoculum was agitated continuously before application, and was applied as 10  $\mu\text{l}$  droplets to 1.0-cm-diameter leaf or petal disks or entire leaflets or petals by means of an automatic pipette.

### *Germination and germ tube growth.*

To estimate germination incidence and germ tube length of *C. rosea* and of *B. cinerea*, one-cm-diameter disks of inoculated leaves or petals were mounted in lactophenol containing 0.05% trypan blue on microscope slides, gently heated over a flame for two minutes to clear the tissues, and examined on a compound microscope (Saha et al., 1988). Germination incidence was estimated from observation of 100 conidia on each disk. A spore was considered germinated when length of the germ tube exceeded the greatest diameter of the spore. Germ tube length was measured in 10 germinated conidia selected arbitrarily on each disk, except when tubes were long, intermingled, and not easily distinguishable.

#### *Endophytic development.*

Endophytic establishment or colonization by *C. rosea* and *B. cinerea* in the host were evaluated indirectly by quantifying the potential of the fungi to sporulate on the tissues. To estimate sporulation potential, tissues were disinfested in 70% ethanol for 10 s and in 2.0% sodium hypochlorite (5.95% Javex) for 10 s, rinsed three times in sterile distilled water, and transferred to paraquat-chloramphenicol agar (PCA) medium in Petri dishes (Peng and Sutton, 1991). Sporulation was estimated after the tissues has been incubated at 25°C for 4, 7, and 11 days.

#### *Sporulation.*

Sporulation of *C. rosea* and *B. cinerea* on host tissues was quantified by estimating the percent tissue area with conidiophores of the respective fungi. To estimate sporulation of *C. rosea*, an eight-category scale developed previously from direct counts of conidiophores on 1-cm diameter disks of rose leaves was used (M.A.B. Morandi and L.A. Maffia, unpublished). The categories with equivalent mean percent area of tissues with conidiophores and, in parentheses, the range of percent tissue area with conidiophores and mean number of conidiophores per disk were as follows: 0 = 0% (0,0); 1 = 2% (1 - 3%, 7.5); 2 = 5% (4 - 6%, 18.7); 3 = 10% (7 - 13%, 37.5); 4 = 20% (14 - 27%, 75.0); 5 = 40% (28 - 52%, 150); 6 = 70% (53 - 87%, 263); and 7 = 94% (88 - 100%, 353). To estimate sporulation of *B. cinerea*, an eight-category scale was used (Peng and Sutton, 1991). The categories with equivalent mean percent area of tissues with conidiophores and, in parentheses, the range of percent tissue area with conidiophores and mean number of conidiophores per disk were as follows: 0 = 0% (0, 0); 1 = 2% (1-3%, 6.5); 2 = 5% (4-6%, 18.5); 3 = 10% (7-12%, 36.5); 4 = 20% (13-26%, 74.5); 5 = 40% (27-53%, 150.5); 6 = 65% (54-76%, 250.5), 7 = 90% (77-100%, 350.5). For each scale, mean percent values were used for data analysis.

#### *Developmental stages of leaves and petals.*

Leaves and petals used for various experiments were categorized as mature, senescent, and dead. Mature leaves were green, fully expanded, and attached to the host plant when selected for use. Senescent leaves were yellow and attached. Mature petals were from outer portions of harvest-ready flower buds, and senescent petals were taken from flowers that had been fully opened for 4 to 5 days. Dead leaves and petals were dry, pale brown, unfragmented, lacked sporulation of microfungi, and had fallen 4 to 6 days prior to collection.

#### *Effects of developmental stage of host organs.*

Growth and sporulation of *C. rosea* was investigated in leaves and petals at each of the three developmental stages. Groups of 1-cm-diameter disks of leaf laminae, 1-cm-long segments of leaf petioles, and 1-cm-diameter petal disks were prepared. Disks or segments of each group were placed on fiberglass screen (1mm mesh) over moist paper towels in Petri dishes. A 10 µl droplet of *C. rosea* inoculum, or of water plus surfactant only, was placed near the center of each disk or segment, and the tissues were incubated at 25°C. There were sixty leaf disks, eighteen petiole segments, and sixty petal disks of each developmental stage arranged in a completely randomized design. Germination incidence, germ tube growth, and endophytic development of *C. rosea* were estimated in the various tissues. Germination and germ tube growth were quantified on five leaf disks and five petal disks taken from within each group at 14 and 24 h after inoculation. To estimate endophytic development, arbitrarily selected leaf disks, petal disks and petiole segments of each group were surface disinfested and placed on PCA at 48 h after inoculation. Percent area of tissues with conidiophores of *C. rosea* was estimated for 20 leaf disks, 20 petal disks, and 12 petiole segments after 4, 7, and 11 days of incubation.

#### *Effects of wounds.*

Tissue wounds were investigated in relation to growth and sporulation of *C. rosea* in mature leaves that were detached and washed twice or not washed. For washing, each leaf was shaken in 250 ml sterile water for 1 minute and air dried. Ten leaflets from the washed leaves and ten from unwashed leaves were wounded by means of a needle apparatus. The apparatus comprised stainless-steel needles 32 mm long and 0.2 mm diameter mounted in a plastic holder. Eight needles were mounted with their points spaced equidistantly in a circle of 5 mm diameter, and one needle was at the center of the circle. For each leaflet the apparatus was used to make nine holes, each about 0.2 - 0.3 mm diameter, at each of five sites that were approximately equidistant from each other and from the leaflet margin. Ten other leaflets from washed leaves and ten from unwashed leaves were not wounded. Leaflets were inoculated by placing a 10 µl droplet of *C. rosea* inoculum on each wound site and at equivalent sites in nonwounded leaflets, and immediately placed in high humidity in Petri dishes. Five leaflets of each treatment were removed from the humid chambers after 14 h and five after 24 h. At each time of sampling, one disk was cut at an arbitrary inoculation site on each leaflet and used for estimating germination

and germ tube growth of *C. rosea*. Two other disks from each leaflet were used to estimate endophytic development.

In a similar study, wounds and wound age were investigated in relation to development of *C. rosea* and *B. cinerea* inoculated alone and in combination in unwashed leaflets of mature leaves. Leaflets were either not wounded, or were wounded at 0, 1, 3, 6, and 24 h before inoculation. For inoculation, droplets of *C. rosea* or *B. cinerea* inoculum were positioned over wounds or on equivalent sites on nonwounded leaflets. Leaflets inoculated with the agent or pathogen only were kept at high humidity in Petri dishes for 24 h after which germination, germ tube growth, and endophytic development were estimated for each fungus. For combined inoculations, leaflets were inoculated with *C. rosea*, kept in high humidity for 24 h, air dried, challenge-inoculated with *B. cinerea*, and kept in high humidity for a further 24 h. Germination, germ tube length (*B. cinerea* only) and endophytic development were then estimated in disks taken from five leaflets per treatment.

#### *Effects of a preinoculation humid period.*

Senescent and dead leaflets were inoculated with *C. rosea* or with *B. cinerea*, or were treated only with water plus surfactant, immediately or after 24 h in high humidity at 25°C. After inoculation, leaflets were kept at high humidity at 25°C for 24 h after which surface moisture was air dried. Some leaflets that were treated with *C. rosea*, incubated in high humidity, and air dried for 30 min, were immediately challenge-inoculated with *B. cinerea* and incubated and air dried as before. Five 1-cm-diameter disks were cut from each of five leaflets in each treatment. One disk from each leaflet (five disks per treatment) was used to estimate germination and germ tube growth of *C. rosea* and *B. cinerea*, and the remaining four disks (20 disks per treatment) were transferred to the PCA medium for estimation of tissue areas with conidiophores of *C. rosea*, *B. cinerea*, and indigenous fungi. Tissue area with sporulation of indigenous fungi was estimated by means of an equi-incremental scale (0, 1-10...91-100%).

#### *Effects of indigenous microfungi.*

One isolate of each of three chief fungi found on the leaves was examined in relation to development of *C. rosea* and *B. cinerea* on the host. Leaflets detached from green leaves were inoculated with *Penicillium* sp. or with *Aspergillus* sp. (each at  $10^7$  conidia ml<sup>-1</sup> water plus surfactant), or with *Alternaria alternata* ( $5 \times 10^5$  conidia ml<sup>-1</sup>), incubated in high humidity at 25°C for 24 h and air dried. Leaflets treated with each fungus were inoculated with *C. rosea*, *B.*

*cinerea*, *C. rosea* plus *B. cinerea*, or with water plus surfactant, incubated in high humidity, and assessed for germination, growth, and sporulation.

#### *Experimental design and data analysis.*

Each experiment was conducted with a completely randomized design and repeated once. Statistical computations were performed using the Statistical Analysis Systems (SAS Institute Inc., Cary, NC). Data for conidial germination, length of germ tubes and fungal sporulation were examined using analysis of variance (ANOVA) and treatment means were compared by the protected least significant difference test (PLSD; Snedecor and Cochran, 1989). Analysis of data of the two experimental repetitions invariably resulted in treatment effects in the same significance classes. Accordingly, in all experiments, data of one repetition are presented.

## **Results**

#### *Effects of developmental stage of host organs.*

Germination incidence of *C. rosea* 14 h after inoculation was moderate on mature and senescent leaves (47% and 35%, respectively) and on mature and senescent petals (31% and 43% respectively), but exceeded 98% on dead leaves and petals. More spores germinated on mature leaves than on senescent leaves, but germination on mature and senescent petals did not differ significantly. Germination incidence increased on mature and senescent leaves and petals when the humid period was extended to 24 h (Figure 1). At that time, germination on senescent leaves (93%) exceeded that on mature leaves (68%), while germination on mature and senescent petals was similar (60-61%) and well below that on dead petals (95%).

Germ tube length of *C. rosea* 14 h after inoculation was similar on dead leaves and petals (62 - 77  $\mu$ m) and in each instance was greater than on mature and senescent tissues. At 24 h after inoculation, germ tubes were 240 - 250  $\mu$ m on senescent and dead leaves and on dead petals, but shorter (52 - 58  $\mu$ m) on mature leaves and on mature and senescent petals (Figure 1).

Sporulation of *C. rosea* was observed on laminae and petioles of leaves, and on petals, that were mature, senescent, or dead when inoculated. Observations for leaves transferred to PCA medium after 14 and 24 h of high humidity did not differ significantly, so were combined (Figure 2). Estimated mean area of leaf laminae with sporulation after 7 days on PCA was highest (75%) for dead leaves, intermediate (60%) for senescent leaves, and least (41%) for mature leaves. In petioles, tissue area with sporulation

was high (73 to 90%) for mature, senescent, and dead leaves, and significantly higher for mature tissues than dead tissues. In petals, the sporulation area was high (87%) for senescent tissues, and moderate (48 - 53%) for mature and dead tissues; this pattern was found also after 11 days of incubation. The sporulation area on laminae and petioles of mature, senescent and dead leaves did not differ significantly after 11 days on PCA.

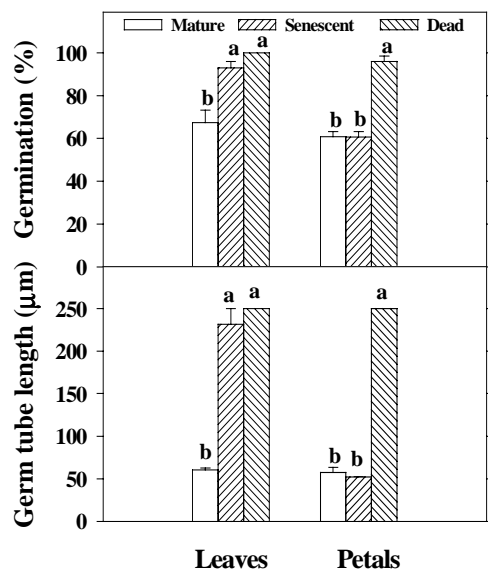


Figure 1. Estimated germination incidence and germ tube length of *Clonostachys rosea* in mature, senescent, and dead leaves and petals of rose at 24 h after inoculation. Data bars are mean values each with a standard error bar. Treatment means for a given host organ, followed by the same letter, are not significantly different (protected LSD,  $P \leq 0.05$ ).

#### Effects of wounds.

Germination, term tube growth, and sporulation of *C. rosea* on leaves that were washed or not washed did not differ significantly ( $P \leq 0.01$ ) so data for the respective variables were combined. Germination incidence ( $\pm$  SE) of *C. rosea* was much higher on wounded leaves than on nonwounded leaves at 14 h after inoculation (respectively  $90 \pm 2.7\%$  and  $45 \pm 4.1\%$ ) and at 24 h after inoculation (respectively  $92 \pm 1.9\%$ , and  $56 \pm 5.6\%$ ). At 14 h, germ tubes on wounded leaves were, on average, more than six times longer ( $158 \pm 15 \mu\text{m}$ ) than on nonwounded leaves ( $22 \pm 2.6 \mu\text{m}$ ), and at 24 h were more than four times longer ( $240 \pm 6.2 \mu\text{m}$  compared to  $55 \pm 14.4 \mu\text{m}$ ).

Wounding of leaves before inoculation with *C. rosea* significantly increased ( $P \leq 0.05$ ) conidiophore production of the agent after the leaves were kept in high humidity for 14 h and transferred to PCA. As the period on PCA was lengthened from 4 to 11 days, the estimated area of tissues with conidiophores increased from 21 to 89% on wounded leaves, and from 7 to 75% on nonwounded leaves. Observations for leaves kept in high humidity for 24 h after inoculation were not significantly different ( $P \leq 0.05$ ) from those removed at 14 h.

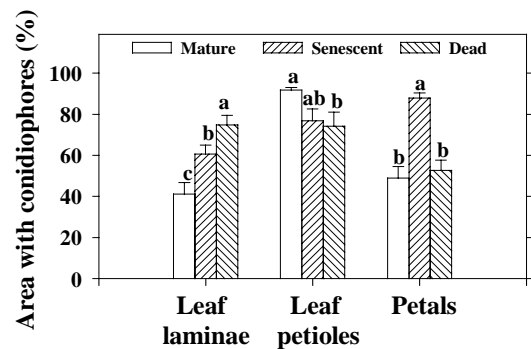


Figure 2. Estimated conidiophore production by *Clonostachys rosea* in leaf disks, petiole segments, and petal disks that were cut from mature, senescent, or dead rose tissues, inoculated with *C. rosea*, kept in high humidity, and incubated on an agar medium containing paraquat for 7 days. Data bars are mean values each with a standard error bar. Treatment means for a given host organ, followed by the same letter, are not significantly different (protected LSD,  $P \leq 0.05$ ).

Almost all conidia of *C. rosea* (>88%, data not presented) and of *B. cinerea* (92 - 94%) germinated on leaves inoculated with the respective fungi at 0, 1, 3, 6, or 24 h after wounding (Figure 3). When leaves inoculated with *C. rosea* were challenge-inoculated after 24 h with *B. cinerea*, germination incidence of the pathogen was high (91%) on leaves treated with *C. rosea* immediately after wounding, declined to 68% on those treated at 1 h after wounding, and stabilized at 53 to 55% on those treated at 3 to 24 h after wounding. Germ tubes of *B. cinerea* averaged 130 - 190  $\mu\text{m}$  in length on wounded leaves inoculated with the pathogen only. Germ tubes on leaves inoculated at 0 to 6 h after wounding were of similar length, but those on leaves inoculated after 24 h were longer (190  $\mu\text{m}$ ) than those inoculated at 1 or 3 h. Treatment of leaves with *C. rosea* before inoculation with *B. cinerea* reduced germ tube growth of the

pathogen (Figure 3). Germ tubes of *B. cinerea* were 24 and 29% shorter, respectively, when *C. rosea* was applied to leaves at 0 and 1 h after wounding, and 50 to 58% shorter when applied at 3, 6 or 24 h, compared to leaves without *C. rosea*.

The time of inoculation of leaves following wounding with the needle apparatus had only minor effects on sporulation of *C. rosea* and *B. cinerea* after the tissues were incubated on PCA. Conidiophore production by *C. rosea* when applied alone at 0 to 6 h after wounding was 73 to 84% and did not differ significantly ( $P \leq 0.05$ ), but significantly less (67%) when applied at 24 h.

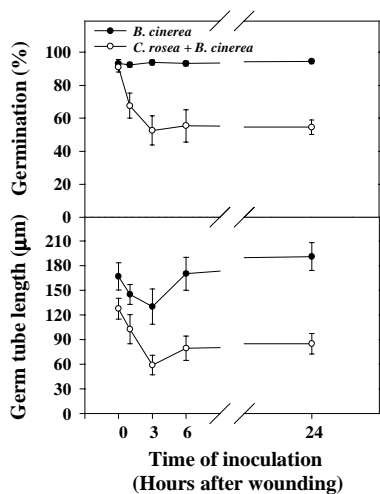


Figure 3. Estimated incidence of germination and length of germ tubes of *Botrytis cinerea* in disks of mature rose leaves that were wounded with a needle apparatus, and inoculated after various times with the pathogen, or with *Clonostachys rosea* followed after 24 h with *B. cinerea*. Curves show mean values with standard error bars.

Similarly, leaf areas with conidiophores of *B. cinerea* when the pathogen was applied alone at 0 to 6 h after wounding were 70 to 80% and not significantly different ( $P \leq 0.05$ ), but lower (61%) when inoculated at 24 h. In the combined treatments, in which wounded leaves were inoculated with *C. rosea* and 24 later with *B. cinerea*, the agent sporulated on 65 to 67% of leaf area when applied at 0 or 1 h after wounding and on significantly greater areas (77 to 80%) when applied at 3 to 24 h. Leaf area with sporulation of the pathogen was only 0 to 1%, regardless of the time of inoculation, when wounded leaves were treated with *C. rosea*.

#### Effects of a preinoculation humid period.

A 24-h humid period prior to inoculation with *C. rosea* or with *B. cinerea* did not significantly affect germination of either fungus on the leaves ( $P \leq 0.05$ ). Germination of *C. rosea* conidia was 70 to 80% on senescent leaves and 97 to 98% on dead leaves; respective values for *B. cinerea* were 63 to 70% and 95 to 99%. Application of *C. rosea* before *B. cinerea* significantly reduced germination of the pathogen by 18% and 33% ( $P \leq 0.05$ ), respectively, on senescent leaves that did or did not receive a preinoculation humid period. On dead leaves, the agent significantly reduced germination of *B. cinerea* by 88% following a preinoculation humid period and by 62% in the absence of the humid period.

The preinoculation humid period also did not significantly affect ( $P \leq 0.05$ ) lengths of germ tubes of *B. cinerea*, which averaged 33 to 54 µm on senescent leaves and 232 to 246 µm on dead leaves. Application of *C. rosea* prior to *B. cinerea* reduced germ tube length of the pathogen by 58 to 65% in senescent leaves and by 81 to 91% in dead leaves.

The preinoculation humid period did significantly reduce ( $P \leq 0.05$ ) conidiophore production of *C. rosea* and *B. cinerea* on the leaves. In leaves inoculated with *C. rosea* only, preinoculation high humidity reduced estimated mean areas of disks with conidiophores of the agent after 11 days on PCA from 78% to 67% for senescent leaves and from 88% to 76% for dead leaves. In leaves inoculated with *B. cinerea* only, the humid period reduced conidiophores of the pathogen from 55% to 43% in senescent leaves, and from 69% to 51% in dead leaves. In senescent and dead leaves inoculated with *C. rosea* and challenged after 24 h with *B. cinerea*, estimated areas with conidiophores of the pathogen were extremely low (0.1 to 2.1% and 1.3 to 2.3% respectively), and not significantly affected by preinoculation high humidity ( $P \leq 0.05$ ).

Incubation of leaves in high humidity for 24 h before tissues were transferred to PCA increased conidiophore production by indigenous fungi on the disks (Figure 4). Increases for dead leaves were greater than those for senescent leaves. Principal fungi sporulating on the tissues included species of *Penicillium*, *Aspergillus* and *Alternaria*.

#### Effects of indigenous microfungi.

Isolates of *Aspergillus* sp. and *Alternaria alternata* Fr.: Keissler, applied to green leaves 24 h before *B. cinerea*, each suppressed germination of *B. cinerea* markedly and as effectively as *C. rosea* (Figure 5). The isolate of *Penicillium* sp. was moderately suppressive. Combination treatment of *C. rosea* with *Aspergillus* sp. reduced germination of the pathogen to about the

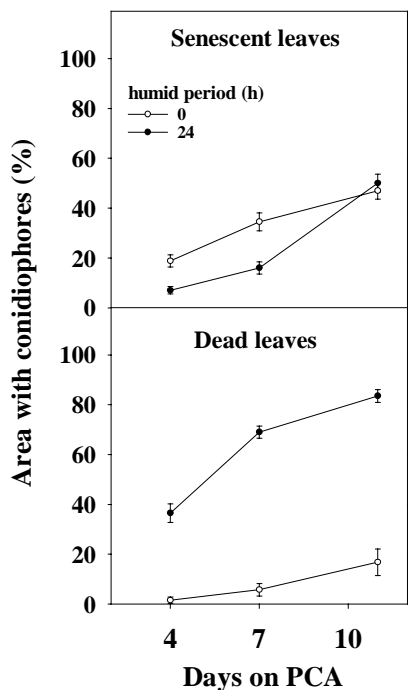


Figure 4. Effects of exposing senescent and dead leaves to high humidity for 24 h on conidiophore production by indigenous fungi in disks taken from the leaves and incubated for various periods on an agar medium containing paraquat (PCA). Curves show mean values plus standard error bars.

same level as did *Aspergillus* sp. alone. However, *C. rosea* increased suppression of *B. cinerea* by *Penicillium* sp. and dramatically decreased suppressiveness of *A. alternata*. Observations of the indigenous microfungi and *C. rosea* on germ tube growth of *B. cinerea* were highly variable and in most instances did not differ significantly.

Applied alone, *C. rosea* produced conidiophores on about 75% of leaf surface area (Figure 6). Sporulation of the agent was not affected significantly on leaves also inoculated with *B. cinerea*, *Aspergillus* sp., or *Penicillium* sp., but was greatly reduced by *A. alternata*. Combinations of *Aspergillus* sp. with *B. cinerea* and *Penicillium* sp. with *B. cinerea* reduced sporulation of *C. rosea* compared to either fungus alone, but *A. alternata* with *B. cinerea* was not more suppressive than *A. alternata* alone.

Applied alone, *B. cinerea* produced conidiophores on 90% of inoculated leaf area, but on only 22% in leaves previously treated with *Aspergillus* sp. only, and on less than 1% in those

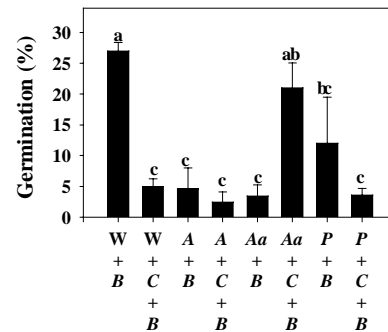


Figure 5. Germination incidence of *Botrytis cinerea* in green rose leaves that were inoculated with *Aspergillus* sp. (A), *Alternaria alternata* (Aa), or *Penicillium* sp. (P), alone or, after 24 h, also with *Clonostachys rosea* (C), and challenge-inoculated with the pathogen (B). Data bars are mean values each with a standard error bar. Data bars assigned the same letter are not significantly different ( $P \leq 0.05$ , protected LSD).

previously treated with *A. alternata*, *Penicillium* sp., or *C. rosea* only (Figure 6). A combination of *Aspergillus* sp. with *C. rosea* was more suppressive than *Aspergillus* sp. alone, and as suppressive as *C. rosea* alone.

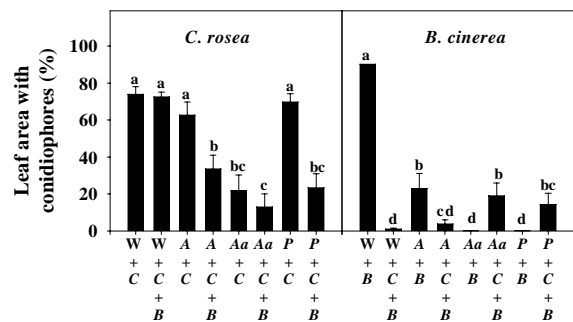


Figure 6. Effects of applications to green rose leaves of *Aspergillus* sp. (A), *Alternaria alternata* (Aa), *Penicillium* sp. (P) or water plus surfactant (W), plus after 24 h *Botrytis cinerea* (B), or *Clonostachys rosea* (C), or *C. rosea* plus after a further 24 h *B. cinerea*, on conidiophore production by *C. rosea* and *B. cinerea* in disks taken from the leaves and incubated on an agar medium containing paraquat. Data bars are mean values each with a standard error bar. Data bars assigned the same letter are not significantly different ( $P \leq 0.05$ , protected LSD).

However, combinations of *A. alternata* with *C. rosea* and of *Penicillium* sp. with *C. rosea* were, in each instance, less suppressive than either fungus alone. After leaves inoculated with combinations of *C. rosea* with *B. cinerea*, *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. or *A. alternata* and incubated on PCA for 20-25 days, abundant hyphae and conidiophores of *C. rosea* were present on colonies of the pathogen and each indigenous fungus, hyphae of which appeared deteriorated.

## Discussion

*Clonostachys rosea* germinated, established endophytic growth, and sporulated abundantly in rose leaves and petals, whether the tissues were mature, senescent, or dead when inoculated. Germination and germ tube growth were moderate or high on all tissues tested, though usually greater on dead tissues, possibly on account of greater nutrient availability. By inference from estimates of conidiophore production on tissues kept on PCA, colonization and sporulation potential of *C. rosea* were moderate to high for all leaf and petal tissues investigated. Previous evidence indicated that colonization of leaves and petals of various hosts by *C. rosea* is rapid and intensive chiefly when the tissues senesce and die, so that sporulation potential increases markedly at these stages (Sutton et al., 1997). Availability of nutrients in tissues likely influenced colonization density, and as a consequence, observed levels of conidiophore production. Findings that *C. rosea* sporulated heavily on leaves and petals inoculated at various developmental stages underscored a potential for sustained association of the agent with rose crops.

Wounding of rose leaves with the needle apparatus prior to inoculation vastly increased germination incidence and germ tube growth of *C. rosea* and accelerated conidiophore production by the agent when the tissues were incubated on PCA. Almost all conidia germinated on wounded leaves, whether applied immediately or at 1 to 24 h after wounding, whereas only about half germinated on nonwounded leaves. The effects of preinoculation wounding on *C. rosea* probably resulted in part from stimulation of the agent by nutrients leaking from wounded cells into wetness films on the phylloplane. In the absence of wounds, low nutrient availability may have limited germination and growth of *C. rosea* on leaves as was implicated in other hosts (Sutton et al., 1997; Yu and Sutton, 1997). In unpublished studies (M.A.B. Morandi, 1999), conidia of the agent germinated poorly or not at all in water on microscope slides, so may be dependent on

exogenous nutrients. While conidiophores on nonwounded leaves developed about 24 to 36 h after those on wounded leaves, areas with conidiophores subsequently were similar regardless of wounding.

Competition for available nutrients probably contributed to the observed interactions between *C. rosea* and *B. cinerea* on the leaves. As in *C. rosea*, exogenous nutrients stimulate germination and growth of *B. cinerea* on host plants (Blakeman, 1980). Decreasing nutrient concentration in moisture films on wounded leaves with time after wounding, perhaps through increased dilution or utilization by indigenous microbes, may have intensified nutrient competition between *C. rosea* and *B. cinerea*. Greater nutrient competition might account for the observations that *C. rosea* was increasingly effective against a challenge inoculation of *B. cinerea* when the agent was applied to leaves at 1 and 3 h after wounding compared to 0 h. While *C. rosea* suppressed *B. cinerea* on the phylloplane, in some instances by 40 to 50% or more, the agent reduced conidiophore production of the pathogen by 99 – 100%, regardless of time between wounding and inoculations. Accordingly, antagonism during tissue colonization probably was of overwhelming importance for reducing sporulation potential of *B. cinerea*, as was concluded also in raspberry (Yu and Sutton, 1997).

Circumstantial evidence indicated that indigenous fungi mediated the moderate reductions in sporulation of *C. rosea* and *B. cinerea* associated with the preinoculation humid period. Based on observations of conidiophores, densities of indigenous fungi increased markedly when senescent and dead leaves were kept in high humidity for 24 h. While not measured, bacteria also might have increased. Elevated densities of indigenous microbes potentially suppressed colonization and sporulation of *C. rosea* and *B. cinerea* through intensified substrate competition or other modes of antagonism within the tissues. Although sporulation was reduced, germination of *C. rosea* and *B. cinerea* on the phylloplane were not affected, at least when each fungus was inoculated alone. Notwithstanding the moderate suppression of *B. cinerea* conidiophores associated with the preinoculation humid period, few or no conidiophores of the pathogen were produced in leaves that were inoculated with *C. rosea* plus the pathogen, regardless of preinoculation high humidity and promotion of indigenous microbes.

Findings that the isolates of indigenous fungi suppressed germination and sporulation of *B. cinerea* in rose leaves were consistent with earlier observations in rose and other hosts (Redmond et al., 1987; Peng and Sutton, 1991;

Sutton et al., 1997; Tatagiba et al., 1998). However, important interactions were found between these isolates, *C. rosea* and *B. cinerea*. For example, *A. alternata*, alone or in combination with *B. cinerea*, reduced sporulation of *C. rosea*, as did *Aspergillus* plus *B. cinerea* and *Penicillium* plus *B. cinerea*. Sporulation of *B. cinerea* was reduced by 99% in leaves treated with *C. rosea* alone, but by only 83% in leaves treated with *C. rosea* plus *Penicillium* sp., and by 78% in those treated with the agent plus *A. alternata*. Thus while the indigenous microbes each potentially contributed to control of *B. cinerea*, high inoculum density of the microbes in combination with *C. rosea* provided less effective control than the agent alone. There was no indication, however, that natural densities of indigenous microbes would seriously compromise the ability of the agent to control *B. cinerea* in rose foliage.

In conclusion, *C. rosea* exhibited high flexibility in associating with leaves and petals of rose, and in controlling sporulation of *B. cinerea* in leaf and petal residues. The agent established in the host and effectively suppressed the pathogen regardless of the developmental stage of the host organs and presence of minor tissue wounds, a finding that is relevant in roses injured by production practices or by pests such as aphids and mites (Morandi et al., 2000). Further, *C. rosea* functioned well as a control agent whether or not the rose tissues were subjected to humid conditions that increased the natural microflora, which included several cosmopolitan genera of fungi. Given the versatility of *C. rosea*, the agent can be expected to control sporulation of *B. cinerea* in rose production systems, provided that temperature and humid periods are favorable, and especially when targeted at both the living foliage and flowers, and crop residues. The role of *C. rosea* in controlling sporulation of *B. cinerea* generally is not fulfilled by available fungicides, which interfere chiefly with the infection process and generally are not effective against the pathogen in crop residues (Köhl and Fokkema, 1998).

#### Acknowledgements.

Financial support was provided to the second author by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. M.A.B. Morandi was supported by a one-year scholarship provided by 'Fundação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior' (CAPES) of Brasília.

#### References

- Blakeman JP (1980) Behaviour of conidia on aerial plant surfaces. In: Coley-Smith JR Verhoeff K and Jarvis WR (eds) *The Biology of Botrytis* (pp 115-151) Academic Press, London
- Elad Y and Volpin H (1991) Heat treatment for the control of rose and carnation grey mould (*Botrytis cinerea*). *Plant Pathology* 40:278-286
- Elad Y and Evensen K (1995). Physiological aspects of resistance to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 85:637-643
- Elad Y (1988) Latent infection of *Botrytis cinerea* in rose flowers and combined chemical and physiological control of the disease. *Crop Protection* 7:361-366
- Elad Y Kirshner B and Gotlib Y (1993) Attempts to control *Botrytis cinerea* on roses by pre- and post-harvest treatments with biological and chemical agents. *Crop Protection* 12:69-73
- Hammer PE and Marois JJ (1989) Nonchemical methods for post-harvest control of *Botrytis cinerea* on cut roses. *J Amer Soc Hort Sci* 114:100-106
- Hammer PE and Evensen KB (1994) Differences between rose cultivars in susceptibility to infection by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 84:1305-1312
- Hausbeck MK and Moorman GW (1996) Managing *Botrytis* in greenhouse-grown flower crops. *Plant Dis* 80:1211-1219
- Horst RK (1983) *Compendium of Rose Diseases*. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN
- Jarvis WR (1992) *Managing Diseases in Greenhouse Crops*. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN
- Köhl J and Fokkema NJ (1998) Strategies for biological control of necrotrophic fungal pathogens. In: Boland GJ and Kuykendall LD (eds) *Plant-Microbe Interactions and Biological Control* (pp 49-88) M. Dekker Inc. New York
- Morandi, MAB, Sutton JC and Maffia LA (2000) Relationships of aphid and mite infestations to control of *Botrytis cinerea* by *Clonostachys rosea* in rose (*Rosa hybrida*) leaves. *Phytoparasitica* 28 (in press)
- Peng G and Sutton JC (1991) Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. *Can J Plant Pathol* 13:247-257
- Redmond JC, Marois JJ and MacDonald JD (1987) Biological control of *Botrytis cinerea* on roses with epiphytic microorganisms. *Plant Dis* 71:799-802

- Saha DC, Jackson MA and Johnson-Cicalese C (1988) A rapid staining method for detection of endophytic fungi in turf and forage grasses. *Phytopathology* 78:237-239
- Schroers HJ, Samuels GJ, Seifert KA and Gams W (1999) Classification of the mycoparasite *Clonostachys rosea* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. *Mycologia* 91:365-385
- Snedecor GW and Cochran WG (1989) *Statistical methods*. 8<sup>th</sup> ed. The Iowa State University Press
- Sutton JC (1995) Evaluation of microorganisms for biocontrol: *Botrytis cinerea* and strawberry, a case study. In: Andrews JH and Tommerup I (eds) *Advances in Plant Pathology*, Vol. 11 (pp. 173-190). Academic Press, London
- Sutton JC, Li D-W, Peng G, Yu H, Zhang P and Valdebenito-Sanhueza RM (1997) *Gliocladium roseum*, a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Dis* 81:316-328
- Tatagiba JdaS, Maffia LA, Barreto RW, Alfenas AC and Sutton JC (1998) Biological control of *Botrytis cinerea* in residues and flowers of rose (*Rosa hybrida*). *Phytoparasitica*. 26:8-19
- Williamson B (1994) Latency and quiescence in survival and success of fungal plant pathogens In: Blakeman JP and Williamson B (eds) *Ecology of Plant Pathogens* (pp. 187-207). CAB International, Wallingford, UK
- Yu H and Sutton JC (1997) Morphological development and interactions of *Gliocladium roseum* and *Botrytis cinerea* in raspberry. *Can J Plant Pathol* 19:237-246

## Capítulo 3

**Relação de infestações de ácaros e afídeos com o controle de *Botrytis cinerea* por *Clonostachys rosea* em folhas de roseira.**

Morandi, M.A.B., Sutton, J.C., Maffia, L.A. 2000. Relationships of aphid and mite infestations to control of *Botrytis cinerea* by *Clonostachys rosea* in rose (*Rosa hybrida*) leaves. **Phytoparasitica** 28: 55-64.

## Relationships of aphid and mite infestations to control of *Botrytis cinerea* by *Clonostachys rosea* in rose (*Rosa hybrida*) leaves

Marcelo A.B. Morandi<sup>1</sup>, John C. Sutton<sup>1</sup>, and Luiz A. Maffia<sup>2</sup>

Infestations of aphids (*Macrosiphum rosae* L.) and of two-spotted spider mites (*Tetranychus urticae* Koch) were examined in relation to growth and sporulation of *Clonostachys rosea* and *Botrytis cinerea*, and to suppression of the pathogen by the agent, in green rose leaves. Leaves were infested artificially with 10 aphids/leaflet for 3 h, or naturally with 15-30 aphids/leaflet for 7-12 days or with undetermined numbers of mites for 10-12 days. Leaves that had or had not been infested were inoculated with *C. rosea*, with *B. cinerea*, or with *C. rosea* plus *B. cinerea*. Germination incidence and germ tube growth of *C. rosea* and *B. cinerea* on the phylloplane in most instances were much greater in leaves previously infested with aphids or mites compared to noninfested leaves. After combined inoculation, *C. rosea* suppressed germination of *B. cinerea* from 47% to 19% in noninfested leaves, but in leaves that had been infested the agent was ineffective and germination incidence of the pathogen increased to 75-93%. Previous infestation with naturally-introduced aphids or mites, but not brief infestations of artificially-introduced aphids, markedly increased sporulation of *C. rosea* during an initial 7-15 days of incubation on a paraquat agar medium, regardless of whether *B. cinerea* was present. Sporulation of *B. cinerea* was similarly increased when inoculated alone. After 15-20 days, however, conidiophores of the agent or pathogen covered most of the leaf surface in these treatments. In leaves inoculated with *C. rosea* plus *B. cinerea*, the agent suppressed sporulation of the pathogen almost completely in both previously-infested and noninfested leaves. Thus aphid and mite infestations did not compromise the ability of *C. rosea* to suppress inoculum production by *B. cinerea* in the leaves. Increased nutrient availability on the phylloplane through exudation or as honeydew or frass is proposed as a basis to explain effects of the pest infestations on *C. rosea* and *B. cinerea*.

KEY WORDS: Rose; *Clonostachys rosea*; *Botrytis cinerea*; aphids; spider mites; biological control.

### INTRODUCTION

*Botrytis cinerea* Pers.: Fr. is a principal cause of pre- and post-harvest losses of roses (*Rosa hybrida* L.) produced as cut flowers in Brazil. Roses are produced in the Brazilian states of Minas Gerais and São Paulo as long-term perennials in ground beds of polyethylene-covered greenhouses. The greenhouses typically are ventilated by rolling up polyethylene sheeting of the walls and by roof ventilators. Despite abundant ventilation, humid periods in the rose canopies often are long and conducive to *B. cinerea*. Open ventilators also facilitate entry of aphids and mites that frequently infest the rose crops and may interact with the pathogen. *Botrytis cinerea* infects rose flowers and foliage chiefly by conidia dispersed from leaf and petal residues that accumulate on the surface of the ground beds (1). The pathogen generally is quiescent in infected tissues for days or weeks before becoming aggressive, after which symptoms develop (5, 8). Affected rose plants sometimes exhibit lesions on the leaves and vegetative buds, and stem cankers, but economic losses are associated chiefly with flecks, spots, and blighting produced by the pathogen on the petals.

---

Received July 26, 1999; received in final form Nov. 21, 1999; <http://www.phytoparasitica.org> posting Dec. 6, 1999.

<sup>1</sup>Dept. of Environmental Biology, University of Guelph, Guelph, ON, Canada N1G 2W1 [Fax: 1+519-837-0442; e-mail: jsutton@evbhort.uoguelph.ca].

<sup>2</sup>Depto. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000 Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

In Brazilian production systems, disease is controlled conventionally by means of chemical fungicides applied to protect the foliage and flowers against infection, combined with limited sanitation, and canopy management. The measures often fail to achieve industry requirements for disease control, in part because of increases in insensitivity of pathogen populations to fungicides (L.A. Maffia unpublished data, 7). Further, some key markets demand roses that have not been treated with fungicides. From recent observations, more effective and acceptable control might be achieved with microbial agents (6, 10, 16, 17).

An agent with superior performance against *B. cinerea* in rose and various other crops is a fungus known for almost a century as *Gliocladium roseum* Bainier, but recently reclassified as *Clonostachys rosea* (Link: Fr.) Schroers, Samuels, Siefert, and W. Gams [teleomorph, *Bionectria ochroleuca* (Schw.) Schroers and Samuels] (14). A nonpathogenic endophyte, *C. rosea* suppresses *B. cinerea* on the plant surface and within host tissues through nutrient competition, competitive colonization of senescent and dead tissues, hyperparasitism and other modes of antagonism (9, 16, 18). Like other leading antagonists, *C. rosea* is only moderately effective in protecting rose flowers against infection and symptom development (17). However, the agent exhibits extraordinary flexibility in associating with leaves and petals whether living or dead, and, given favourable conditions, is able to suppress sporulation of *B. cinerea* almost completely in leaf and petal residues. Control of the pathogen depends heavily on the ability of *C. rosea* conidia to germinate on the plant surface and establish endophytically. These processes in *C. rosea* are influenced markedly by nutrient availability and tissue wounds (10) as is known also for *B. cinerea* in rose and other hosts (2, 10).

In view of reported effects of wounds and available nutrients on development of *C. rosea* and *B. cinerea* in host tissues, infestations of aphids or mites could interfere with biological control of the pathogen in rose production systems. To explore this possibility, quantitative investigations were conducted of the pests in relation to development and interactions of the agent and pathogen in rose leaves.

## MATERIALS AND METHODS

### *Rose plants*

Plants of rose cv. Sonia were grown in 20-cm-diameter pots containing a soilless mix (Promix<sup>®</sup>, Plant Products Ltd., Brampton, Ont.) in a climate-controlled greenhouse as described (10). The plants were supplied with soluble N:P:K (20:8:20) fertilizer (150 gl<sup>-1</sup> water) once a week.

### *Aphids and mites*

Colonies of Rose aphid (*Macrosiphum rosae* L.) and of two-spotted spider mites (*Tetranychus urticae* Koch) were maintained on rose plants in compartments of a greenhouse.

### *Inocula and inoculations*

Isolate PG-88-710 of *C. rosea* (11) and isolate MM-98-1 of *B. cinerea* were used for inoculations. Conidia of each fungus were produced on potato dextrose agar (PDA) medium under cool-white fluorescent lamps (12-h photoperiod) at 20 to 22°C. The conidia were suspended in sterile distilled water plus surfactant (0.05 ml Triton X-100/100 ml), filtered through three layers of cheesecloth, and diluted to a desired

density as determined with a hemacytometer. For inoculations, the inoculum density of *C. rosea* was  $10^7$  conidia  $\text{ml}^{-1}$  and that of *B. cinerea* was  $10^6$  conidia  $\text{ml}^{-1}$ . Inoculum was agitated continuously before application, and was applied to entire leaves by means of an air-pressurized hand sprayer.

#### *Germination and germ tube growth*

To estimate germination incidence and germ tube length of *C. rosea* and of *B. cinerea*, one-cm-diameter disks of inoculated leaves were mounted in lactophenol containing 0.05% trypan blue on microscope slides, gently heated over a flame for two minutes to clear the tissues, and examined on a compound microscope (13). Germination incidence was estimated from observation of 100 conidia on each disk. Germ tube length was measured in 10 germinated conidia selected arbitrarily on each disk, except when tubes were long, intermingled, and not easily distinguishable.

#### *Endophytic development*

Endophytic establishment or colonization by *C. rosea* and *B. cinerea* in the host were evaluated indirectly by quantifying the potential of the fungi to sporulate on the tissues. To estimate sporulation potential, tissues were disinfested in 70% ethanol for 10 s and in 2.0% sodium hypochlorite (5.95% Javex) for 10 s, rinsed three times in sterile distilled water, and transferred to paraquat-chloramphenicol agar (PCA) medium in petri dishes (11). Sporulation was estimated after the tissues were incubated at 25°C for 4, 7, 11, 15 and 20 days.

#### *Sporulation*

Sporulation of *C. rosea* and of *B. cinerea* on host tissues were quantified by estimating the percent tissue area with conidiophores of the respective fungi. To estimate sporulation of *C. rosea*, an eight-category scale developed previously from direct counts of conidiophores on 1-cm diameter disks of rose leaves (M.A.B. Morandi and L.A. Maffia, unpublished) was used. The categories with equivalent mean percent area of tissues with conidiophores and, in parentheses, the range of percent tissue area with conidiophores and mean number of conidiophores per disk were as follows: 0 = 0% (0,0); 1 = 2% (1-3%, 7.5); 2 = 5% (4-6%, 18.7); 3 = 10% (7-13%, 37.5); 4 = 20% (14-27%, 75.0); 5 = 40% (28-52%, 150); 6 = 70% (53-87%, 263); and 7 = 94% (88-100%, 353). To estimate sporulation of *B. cinerea*, an eight-category scale adapted from Peng and Sutton (11) was used. The categories with equivalent mean percent area of tissues with conidiophores and, in parentheses, the range of percent tissue area with conidiophores and mean number of conidiophores per disk were as follows: 0 = 0% (0,0); 1 = 2% (1-3%, 6.5); 2 = 5% (4-6%, 18.5); 3 = 10% (7-12%, 36.5); 4 = 20% (13-26%, 74.5); 5 = 40% (27-53%, 150.5); 6 = 65% (54-76%, 250.5); 7 = 90% (77-100%, 350.5). For each scale, mean percent values were used for data analysis.

#### *Effects of aphids and mites*

Relationships of aphid colonies and mite infestation to growth and sporulation of *C. rosea* and *B. cinerea*, and to suppression of the pathogen by the agent, were examined in green rose leaves. In the studies, leaves that had been infested artificially or naturally with aphids or naturally with mites, and noninfested leaves, were inoculated with *C. rosea* or *B. cinerea*, or with both fungi. For the artificial infestation, aphids were transferred from stock colonies to moist filter paper in petri dishes, and starved for 24 h at 21-23°C. The aphids were then transferred to leaflets

of detached rose leaves (10 aphids/leaflet), allowed to feed during 3 h, and then removed. Each rose leaf was mounted with the petiole dipping in water inside a clear plastic box. Natural infestations were by spread of aphids or mites from infested to noninfested leaves of rose plants in the greenhouse. Each leaflet used was colonized by 15-30 aphids for 7-12 days or with undetermined numbers of mites for 10-12 days, after which the aphids and mites were removed. Immediately after periods of infestation, leaflets that had or had not been infested with aphids or mites were detached, inoculated with *C. rosea* or *B. cinerea*, and kept on fiberglass screen (1-mm mesh) over moist paper towels in plastic containers for 24 h at 25°C in a growth chamber. In a combined treatment, leaflets inoculated with *C. rosea* and kept in high humidity were challenge-inoculated with *B. cinerea* and returned to the humidity chambers for a further 24 h. After humid periods in the various treatments, estimates were made of germination incidence, germ tube growth, and sporulation potential of *C. rosea* and *B. cinerea*. For each treatment there were five replicate leaflets. One disk cut from each leaflet was used to estimate germination and germ tube growth, and four disks per leaflet were used to estimate endophytic establishment.

#### *Experimental design and data analysis*

The experiments were conducted with a completely randomized design and repeated once. Statistical computations were performed using the Statistical Analysis Systems (SAS Institute Inc., Cary, NC). Data for conidial germination, length of germ tubes and fungal sporulation were examined using analysis of variance (ANOVA) and treatment means were compared by the protected least significant difference test (PLSD; 15).

## **RESULTS AND DISCUSSION**

Germination incidence and germ tube growth of *C. rosea* and *B. cinerea*, when inoculated alone, generally were greater in leaves that had been infested with aphids or mites compared to noninfested leaves (Fig. 1). Artificial infestation of leaves with aphids for a brief (3-h) period markedly promoted germination and growth of *B. cinerea* but did not significantly affect *C. rosea*. In contrast, the natural infestations by aphids or mites greatly increased germination and germ tube growth of both *C. rosea* and *B. cinerea*. The observed effects of the preinoculation infestations probably can be attributed in large part to stimulation of the agent and pathogen by nutrients exuded onto the phylloplane from cells injured by aphids or mites, or deposited there by aphids as honeydew or by mites as frass. Honeydew was abundant on leaves that were naturally infested with aphids for several days, but sparse in leaves infested artificially. Honeydew, which consists of about 95-98% carbohydrates, and small amounts of amino acids, amides, organic acids, and enzymes (3, 12), is known to support growth of numerous saprotrophs and necrotrophs on the phylloplane, including *Botrytis* spp. (4). Following mite infestation, leaves exhibited a mottled appearance characteristic of mite injury, but lacked mite webs. Effects on *C. rosea* and *B. cinerea* similar to those associated with aphid and mite infestations were observed recently in rose leaves that were wounded with needles (10). Plant wounds were reported also to enhance germination and germ tube growth of *B. cinerea* in numerous hosts (2). Germination of the *C. rosea* isolate used in the studies is largely dependent on exogenous nutrients (M.A.B. Morandi 1999, unpublished observations). In *B. cinerea*, nutrient dependency varies widely among isolates (2).

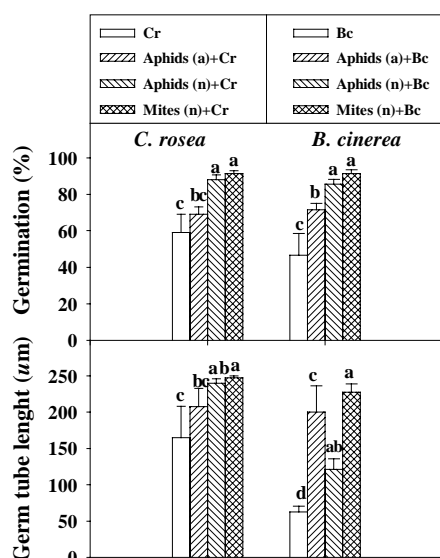


Figure 1. Estimated germination incidence and germ tube length of *Clonostachys rosea* (Cr) and of *Botrytis cinerea* (Bc) in rose leaves that were subjected to artificial (a) infestation of aphids or to natural (n) infestation of aphids or two-spotted spider mites, or that were not infested, and subsequently inoculated with Cr or with Bc. Data bars are mean values each with a standard error bar. Data bars for *C. rosea* or for *B. cinerea* assigned the same letter are not significantly different (protected LSD,  $P \leq 0.05$ ).

Preinoculation infestations of aphids and mites also promoted germination, and, in some instances, germ tube growth of *C. rosea* and *B. cinerea* in leaves inoculated with the agent plus the pathogen (Fig. 2). In the absence of aphid or mite infestations, germination incidence of *C. rosea* was about 59% whether or not *B. cinerea* was present, but germination of *B. cinerea* was reduced from 47% to 19% when *C. rosea* was present. In leaves that had been infested with aphids or mites, however, *C. rosea* failed to suppress germination of *B. cinerea* which, instead, increased to 75 - 93%. The contrasting observations in infested compared to noninfested leaves likely resulted from differences in availability of nutrients on the phylloplane. Thus in leaves that were not previously infested with aphids or mites, phylloplane nutrients probably were sufficiently scarce that *C. rosea* was able to suppress *B. cinerea* through nutrient competition, as concluded for other hosts (16, 18). However, in leaves that had been infested, it is likely that sufficient nutrients were available to allow a high germination incidence of both fungi. Nutrient competition does not necessarily preclude other modes of active antagonism by *C. rosea*, which in raspberry were reported to vary as a function of available nutrients (18).

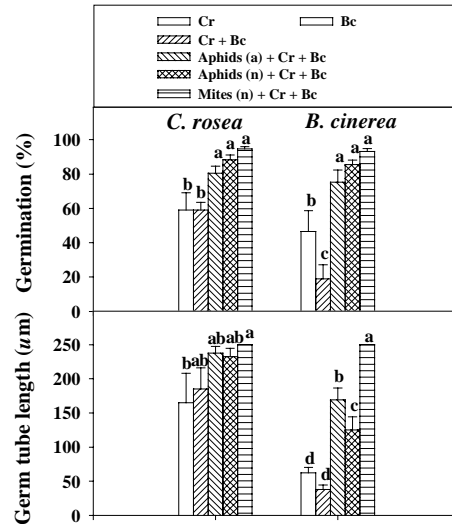


Figure 2. Estimated germination incidence and germ tube length of *Clonostachys rosea* (Cr) and of *Botrytis cinerea* (Bc) in rose leaves that were subjected to artificial (a) infestation of aphids, or to natural (n) infestation of aphids or two-spotted spider mites, or that were not infested, and subsequently inoculated with Cr or Bc alone, or with Cr and 24 h later with Bc. Data bars are mean values with standard error bars. Data bars for *C. rosea* or for *B. cinerea* assigned the same letter are not significantly different (protected LSD,  $P \leq 0.05$ ).

Increased nutrient availability probably accounts also for increased growth of germ tubes of *B. cinerea* in response to aphid and mite infestations, and of *C. rosea* in response to mites (Fig. 2). Observations for *C. rosea* were highly variable such that numerical increases in germ tubes in response to aphids were not significant. Germ tube growth of *B. cinerea* was increased more by mites than by aphids, and brief infestations of artificially-introduced aphids promoted growth more than did 7- to 12-day natural infestations. The data likely reflect complex interactions among nutrient exudation, honeydew deposition, nutrient utilization by *C. rosea*, *B. cinerea*, and the natural microflora, and other interactions among the agent, pathogen and microflora over time.

Besides germination and germ tube growth, the infestations of aphids and mites also influenced sporulation potential of *C. rosea* and *B. cinerea*, and by inference endophytic development and interactions of these fungi in the leaves (Fig. 3). In leaves not previously infested with aphids or mites and inoculated with *C. rosea* only, leaf area with sporulation of the agent progressively increased from about 22% after 4 days on the PCA medium to 90% after 20 days (Fig.3A). In contrast, sporulation in leaves that had been infested naturally with aphids or mites, respectively, was moderately high (43%) and high (83%) after only 4 days on PCA. Conversely, sporulation in leaves that had been infested briefly by artificial transfer of aphids was initially lower than in the noninfested checks. Although infestation treatments markedly affected sporulation of *C. rosea* during the initial 7 to 11 days on PCA, at 20 days conidiophores of the agent covered almost all leaves in all

treatments. A possible interpretation of the data is that the natural infestations of aphids and mites promoted endophytic establishment and development of *C. rosea* that resulted in earlier colonization and sporulation when the leaves died on PCA. The initial suppression of sporulation in leaves briefly infested with artificially-transferred aphids is not understood, but may be associated with enzymes or other ephemeral substances with antifungal properties present in honeydew (3).

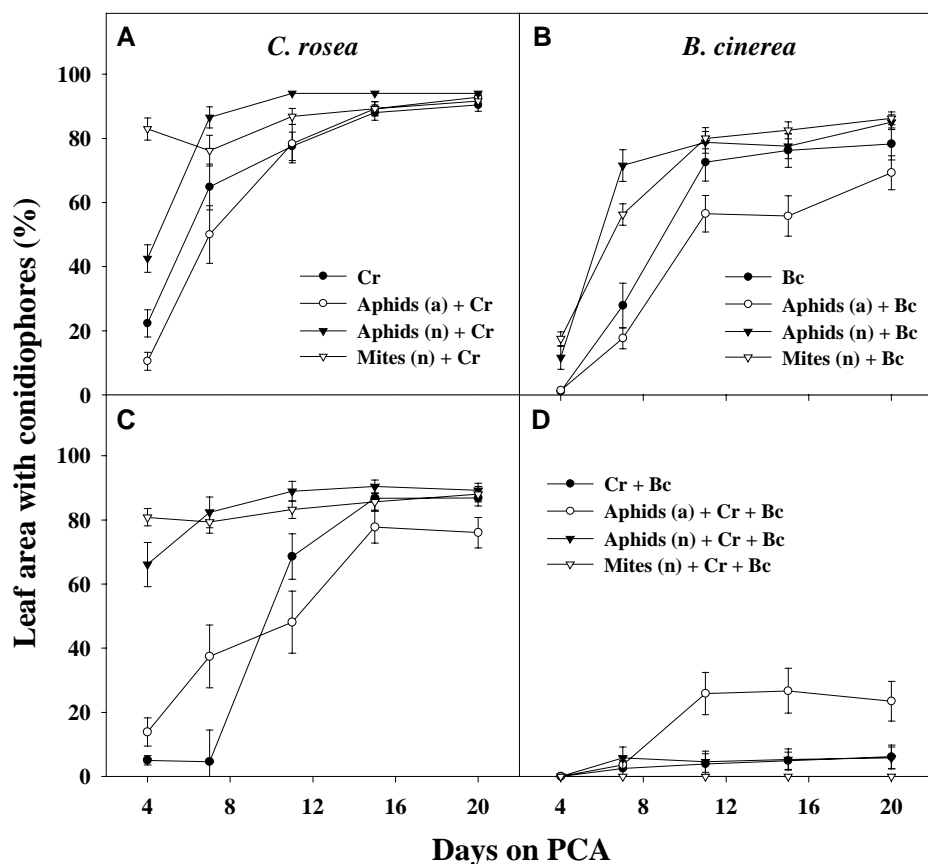


Figure 3. Estimated conidiophore production by *Clonostachys rosea* (Cr) and by *Botrytis cinerea* (Bc) in rose leaves that were subjected to artificial (a) infestation of aphids or to natural (n) infestation of aphids or of two-spotted spider mites, or that were not infested, and subsequently inoculated with Cr only (A), or Bc only (B) or with Cr and 24 h later with Bc (C and D). Curves show mean values plus standard error bars.

In leaves inoculated with *B. cinerea* only, sporulation of the pathogen increased earlier following natural aphid or mite infestation compared to noninfested leaves (Fig. 3B), though less abruptly than was observed for *C. rosea* (Fig. 3A). Leaf area with conidiophores of the pathogen was near 80% and roughly asymptotic at 11-20 days of incubation in noninfested and naturally infested leaves. In leaves

artificially infested with aphids, sporulation of *B. cinerea* was delayed, as observed with *C. rosea*, and the asymptote was lower, compared to other treatments, possibly for the same reasons considered for *C. rosea*.

Sporulation patterns of *C. rosea* and *B. cinerea* in leaves inoculated with both fungi in several instances differed markedly from those inoculated with the agent or pathogen alone (Fig. 3C,D). Sporulation increase of *C. rosea* in leaves that did not receive an aphid or mite infestation was delayed by the presence of *B. cinerea* (Fig. 3A and C), indicating that the pathogen suppressed the agent, perhaps through nutrient competition while on the phylloplane. Sporulation of *B. cinerea*, however, was suppressed almost completely in the presence of *C. rosea* in leaves without aphid or mite infestation and in those that had been infested naturally with either pest (Fig. 3D). For reasons that remain obscure, effectiveness of the agent in suppressing sporulation of *B. cinerea* was reduced in leaves briefly infested with artificially-transferred aphids.

In conclusion, infestations of aphids or mites that were natural, heavy, and lasted for about 7 to 12 days did not significantly interfere with the ability of *C. rosea* to control sporulation of *B. cinerea* in rose leaves. These conclusions relate to circumstances in which aphid or mite infestations preceded inoculation with *C. rosea* and *B. cinerea*, and postinoculation humid periods were highly favorable for the agent and pathogen to establish in the host. From observations that natural infestations of aphids or mites generally promoted germination, growth, and establishment of *C. rosea* and *B. cinerea* in leaves, it can be conjectured that these pests would not compromise pathogen control should humid periods be less favorable than in the present studies, as is often the case in commercial greenhouses. Indeed, in these circumstances, increased endophytic establishment of *C. rosea* might increase control of the pathogen (16). Collectively, the observations enlarge on earlier findings that *C. rosea* exhibits extraordinary flexibility in controlling *B. cinerea* in rose tissues, regardless of host developmental stage, wounds, or associated microflora (10). They also are consistent with the view that *C. rosea* suppresses inoculum production of *B. cinerea* chiefly through substrate competition in senescent or dead host tissues as opposed to antagonism of the pathogen on the phylloplane (10, 16). From the present and previous studies, appropriately timed and targeted applications of *C. rosea* can be expected to markedly reduce inoculum production by *B. cinerea* in rose production systems in Brazil and elsewhere, regardless of infestations of aphids or spider mites. Use of *C. rosea*, perhaps in combination with sanitation and cultural practices, might reduce inoculum density of *B. cinerea* in greenhouses sufficiently that disease severity in the flowers is low enough to meet commercial and consumer requirements.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support was provided to the second author by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. M.A.B. Morandi was supported by a scholarship provided by 'Fundação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior' (CAPES) of Brasília.

## REFERENCES

1. Araújo, E. de A. (1995) Sobrevivência de *B. cinerea* em restos de cultura, efeito de fatores de ambiente sobre o patógeno, e progresso do mofo cinzento em roseiras cultivadas em casa de vegetação (mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.
2. Blakeman, J.P. (1980) Behaviour of conidia on aerial plant surfaces. pp. 115-151 in: Coley-Smith, J.R., Verhoeff, K., and Jarvis, W.R. [Eds.]. *The Biology of Botrytis*. Academic Press, London.
3. Crane, E. (1975) *Honey, a Comprehensive Survey*. Crane, Russak & Company, Inc. New York.
4. Dik, A. (1992) Interactions among fungicides, pathogens, yeasts, and nutrients in the phyllosphere. pp. 412-429 in: Andrews J.H. and Hirano, S.S. [Eds.]. *Microbial Ecology of Leaves*. Springer-Verlag, New York.
5. Elad, Y. (1988) Latent infection of *Botrytis cinerea* in rose flowers and combined chemical and physiological control of the disease. *Crop Prot.* 7:361-366.
6. Elad, Y., Kirshner, B., and Gotlib, Y. (1993) Attempts to control *Botrytis cinerea* on roses by pre- and post-harvest treatments with biological and chemical agents. *Crop Prot.* 12:69-73.
7. Hausbeck, M.K. and Moorman, G.W. (1996) Managing *Botrytis* in greenhouse-grown flower crops. *Plant Dis.* 80:1212-1219.
8. Jarvis, W.R. (1992) *Managing Diseases in Greenhouse Crops*. APS Press, St. Paul, MN, USA.
9. Morandi, M.A.B. (1997) *Gliocladium roseum* como agente de biocontrole de *Botrytis cinerea* em roseiras cultivadas em casa de vegetação (mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.
10. Morandi, M.A.B., Sutton, J.C. and Maffia, L.A. (1999) Effects of host and microbial factors on development of *Clonostachys rosea* and control of *Botrytis cinerea* in rose. *Eur. J. Plant Pathol.* (Submitted June 1999).
11. Peng, G. and Sutton, J.C. (1991) Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. *Can. J. Plant Pathol.* 13:247-257.
12. Rossing, W.A.H. and Van de Wiel, L.A.J.M. (1990) Simulation of damage in winter wheat caused by the grain aphid *Sitobion avenae*. 1 Quantification of the effect of honeydew on gas exchange of leaves and aphid populations of different size on crop growth. *Neth. J. Plant Pathol.* 96:343-364.
13. Saha, D.C., Jackson, M.A. and Johnson-Cicalese, C. (1988) A rapid staining method for detection of endophytic fungi in turf and forage grasses. *Phytopathology.* 78:237-239.
14. Schroers, H.J., Samuels, G.J., Siefert, K.A. and 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.
15. Snedecor, G.W. and Cochran, W.G. (1989) *Statistical Methods*. 8<sup>th</sup> ed. The Iowa State University Press, Ames, IA, USA.

16. Sutton, J.C., Li, D-W., Peng, G., Yu, H., Zhang, P. and Valdebenito-Sanhueza, R.M. (1997) *Gliocladium roseum*, a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Dis.* 81:316-328.
17. Tatagiba, J. da S., Maffia, L.A., Barreto, R.W., Alfenas, A.C. and Sutton, J.C. (1998) Biological control of *Botrytis cinerea* in residues and flowers of rose (*Rosa hybrida*). *Phytoparasitica* 26:8-19.
18. Yu, H. and Sutton, J.C. (1997) Morphological development and interactions of *Gliocladium roseum* and *Botrytis cinerea* in raspberry. *Can. J. Plant Pathol.* 19:237-246.

## Capítulo 4

**Redução da esporulação de *Botrytis cinerea* por *Clonostachys rosea* em restos culturais como componente do manejo do mofo cinzento em roseiras.**

Morandi, M.A.B., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G., Alfenas, A.C., Barbosa, J.G., Cruz, C.D. 2001. Reduction on *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris as a valuable component on gray mold management.

## RESUMO

Conduziram-se ensaios para avaliar o efeito de: i- *Clonostachys rosea* na redução da esporulação de *Botrytis cinerea* e ii-variáveis climáticas sobre a colonização dos restos culturais de roseiras (cultivares Sônia e Red Success) por *B. cinerea* e *C. rosea*, sob condições de casa de vegetação. Para ambos os cultivares, a esporulação do patógeno foi consistentemente menor nos tratamentos onde havia aplicação de *C. rosea* (*C. rosea* e *C. rosea*+mancozeb, para 'Red Success' e *C. rosea*, para 'Sônia'). Com a combinação do fungicida mancozeb com *C. rosea*, houve redução na esporulação do agente ao longo do experimento, a qual, entretanto, não afetou, significativamente, o controle da esporulação de *B. cinerea*. *C. rosea* estabeleceu-se eficientemente nos restos culturais de roseira, verificado pelo incremento da esporulação do fungo ao longo do experimento e pela redução crescente na esporulação de *B. cinerea* nos tratamentos onde o antagonista foi aplicado. A redução na esporulação do patógeno não resultou em redução significativa na incidência do mofo cinzento, provavelmente porque: i- o tratamento com *C. rosea* iniciou-se no final de janeiro, quando a epidemia do mofo cinzento já estava em seu pico máximo; ii- não se realizaram práticas de saneamento ao longo do experimento; e iii- nem todas as plantas da casa de vegetação foram tratadas com *C. rosea*, o que permitiu a multiplicação do patógeno nas plantas da bordadura. Entretanto, em vista dos resultados obtidos, espera-se que o uso continuado de *C. rosea*, ao longo de vários ciclos produtivos, possa reduzir a população de *B. cinerea* no interior das casas de vegetação e proporcionar redução significativa na incidência do mofo cinzento em botões. Analisou-se o efeito das variáveis climáticas sobre a colonização de restos culturais de roseira por *B. cinerea* e *C. rosea* e verificou-se que os requerimentos ambientais para os dois fungos são semelhantes, fato relevante em termos do estabelecimento de uma estratégia para o controle biológico do patógeno. A umidade relativa máxima foi o principal fator de estímulo à colonização dos restos culturais por ambos os fungos, por sua influência direta no teor de umidade dos restos. Por outro lado, a umidade relativa mínima e a temperatura máxima exerceram efeitos diretos negativos sobre a colonização de *B. cinerea* e *C. rosea*, por promover o dessecamento dos restos.

## 1. INTRODUÇÃO

O mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea* Pers.:Fr., está entre as doenças de plantas mais comuns e mais amplamente distribuídas, e provoca danos a grande número de espécies ornamentais, hortícolas, frutíferas e cereais, principalmente em casa de vegetação (Jarvis, 1992). O patógeno pode atacar as culturas em quase todos os estádios de desenvolvimento, ou durante o armazenamento e trânsito, o que, associado a outros fatores, torna seu controle difícil (Gullino, 1992). Nos últimos anos, com o aumento do cultivo protegido no Brasil, o mofo cinzento tem sido um sério problema fitossanitário para diversas culturas, como roseira, morangueiro, tomateiro, crisântemo, eucalipto e outras.

Apesar de os fungicidas ainda serem extensivamente usados no controle de *B. cinerea*, há necessidade de se integrarem outras práticas de manejo do mofo cinzento, para reduzir os problemas causados pelo uso excessivo destes produtos, como a presença de resíduos nas flores, que deprecia o valor comercial dos botões nos mercados mais exigentes, e o surgimento de isolados do patógeno resistentes. Já se verificaram isolados de *B. cinerea* de roseira resistentes a benzimidazoles e dicarboximidas em cultivos onde esses fungicidas eram largamente utilizados (Monteiro, 1996). O controle químico tem sido usado rotineiramente, sem que haja qualquer preocupação sobre seu efeito na microbiota saprofítica, que exerce papel vital no equilíbrio biológico (Dubos, 1992). Em sistemas de manejo do mofo cinzento em que se incorpora o controle biológico, espera-se haver redução da pressão de seleção na população do patógeno e do surgimento de isolados resistentes (Köhl et al., 1995a). A integração de tratamentos químicos com sistemas de manejo cultural, modelos epidemiológicos e agentes de biocontrole é uma estratégia realista e racional para o manejo da doença.

O controle biológico é uma alternativa satisfatória do ponto de vista ambiental para suplementar o controle químico. O controle biológico, que se baseia na competição de um antagonista saprófita com o crescimento micelial saprofítico de *B. cinerea* em restos culturais, ao reduzir o crescimento e a esporulação do patógeno, pode resultar no retardamento de epidemias do mofo cinzento. Uma vantagem adicional desta estratégia é o longo tempo de interação entre o patógeno e o antagonista nos restos culturais. Entretanto, ela será válida quando o progresso da

epidemia depender da quantidade de inóculo produzido dentro do campo tratado com o antagonista, e não haver contribuição significativa de esporos trazidos de fora pelo ar (Köhl et al., 1995a). A principal fonte de inóculo de *B. cinerea* em casas de vegetação comerciais de roseiras são os restos culturais no interior das mesmas e, aparentemente, não há contribuição significativa de esporos trazidos de fora para a epidemia (Araújo, 1995; Monteiro, 1996).

Os restos culturais de roseiras são compostos por pétalas, hastes e, principalmente, folhas, que possuem grande importância na sobrevivência e esporulação de *B. cinerea* (Araújo, 1995; Monteiro, 1996). Diversos autores (Sutton et al. 1978; Sutton et al. 1983; Braun e Sutton, 1987; Araújo, 1995; Monteiro, 1996) recomendam a eliminação de restos culturais como medida imprescindível em programas de manejo do mofo cinzento. Entretanto, essa prática é de difícil execução no atual sistema de produção de rosas no Brasil, pois vários produtores utilizam canteiros formados por duas fileiras duplas. Nesse sistema, as plantas de algumas variedades formam uma copa densa, o que, além de dificultar a remoção de restos, permite a formação de um microclima favorável à esporulação do patógeno (Monteiro, 1996). Em face dessas dificuldades, o uso de um agente de biocontrole que iniba ou reduza a esporulação de *B. cinerea* nos restos de cultura seria alternativa viável no manejo integrado do mofo cinzento em roseiras.

Para suprimir a esporulação de patógenos necrotróficos, como *B. cinerea*, o antagonista deve ser capaz de colonizar rapidamente o substrato, mesmo na presença do patógeno e de competir eficientemente com ele (Köhl et al., 1995b). O hifomiceto *Clonostachys rosea* (Link: Fr.) Schroers, Samuels, Siefert and W. Gams [teleomorfo, *Bionectria ochroleuca* (Schw.) Schroers and Samuels] (Schroers et al., 1999) passou a ser considerado como antagonista potencial a *B. cinerea* em morangueiro (*Fragaria ananassa* Bailey), no final da década de 80 (Peng e Sutton, 1990). Consistentemente, isolados do antagonista suprimiram o patógeno em mais de 98% em ensaios com folhas, pétalas e estames de morangueiro, com eficiência igual ou superior a captan, fungicida padrão no controle da doença (Peng e Sutton, 1991). O antagonista foi eficiente no controle do patógeno em outros hospedeiros, como gerânio (*Pelargonium* sp.), begônia (*Begonia* sp.), ciclâmen (*Cyclamen persicum* Mill.), *Exacum affine* Balf., tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), pimentão (*Capsicum annuum* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), framboesa (*Rubus idaeus* L.) e mudas de abeto preto

(*Picea mariana* (Mill.) B.S.P.) e outras coníferas (Sutton et al., 1997). Sob condições controladas, *C. rosea* inibiu completamente a esporulação do patógeno em restos culturais de roseira e foi o mais efetivo entre 52 organismos avaliados, incluindo fungos filamentosos, bactérias e leveduras (Tatagiba et al., 1998).

Os mecanismos envolvidos na supressão do desenvolvimento e esporulação de *B. cinerea* por *C. rosea* incluem hiperparasitismo, competição por nutrientes e colonização competitiva de tecidos senescentes ou mortos. A habilidade de *C. rosea* em crescer endofiticamente em tecidos verdes confere ao agente uma importante vantagem competitiva em relação ao patógeno, na colonização dos restos culturais (Sutton et al., 1997; Yu e Sutton, 1997; Köhl e Fokkema, 1998; Morandi et al., 2001). Em estudos recentes, *C. rosea* exibiu grande flexibilidade em associar-se com folhas e pétalas de rosa e em controlar a esporulação de *B. cinerea* nos restos culturais (Morandi et al., 2000a,b). O agente estabeleceu-se no hospedeiro e suprimiu o patógeno efetivamente, independente do estágio de desenvolvimento dos tecidos e da presença de ferimentos, fato relevante para o controle do patógeno nos sistemas produtivos, onde as plantas estão sujeitas a injúrias ocasionadas por práticas culturais ou atuação de pulgões e ácaros (Morandi et al., 2000a). Ademais, *C. rosea* foi eficiente no controle de *B. cinerea*, mesmo quando os tecidos do hospedeiro foram submetidos a condição de alta umidade antes da aplicação do agente, o que aumentou a densidade da micoflora natural (Morandi et al., 2000b).

Pouco se conhece sobre a dinâmica de colonização e esporulação de *C. rosea* em restos de cultura. Em estudos recentes, *C. rosea* foi capaz de colonizar e esporular em folhas destacadas de roseira por até um mês, em temperaturas entre 10 e 30°C e foi pouco afetado pela ausência de período prolongado de molhamento foliar após sua aplicação (Morandi et al., 2001). Para *B. cinerea*, as informações são bastante diversas e, em alguns casos, conflitantes. Entretanto, de modo geral, o patógeno é favorecido por temperaturas mais amenas (18 a 22°C), alta umidade relativa do ar (>85%) e presença de água livre na superfície dos tecidos (Jarvis, 1992). Uma vez estabelecido saprofiticamente no tecido senescente, *B. cinerea* é menos dependente das condições ambientais para sobrevivência, porém requer alta umidade, temperaturas amenas e luz, no espectro do infravermelho, para esporular (Hausbeck e Moorman, 1996).

Dada a versatilidade de *C. rosea*, espera-se que o agente seja capaz de controlar eficientemente a esporulação de *B. cinerea* nos sistemas produtivos de rosa quando aplicado a folhas, flores e restos da cultura. Com o objetivo de testar esta hipótese, conduziram-se ensaios visando avaliar o efeito de: i- *C. rosea* na redução da esporulação de *B. cinerea* e ii- variáveis climáticas sobre a colonização dos restos culturais por *B. cinerea* e *C. rosea* em cultivos de roseira sob casa de vegetação.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Época e local do ensaio

Os ensaios foram conduzidos de janeiro a maio de 2000, em casa de vegetação com cobertura plástica de 22 x 35 m, cultivada com os cultivares Sônia e Red Success, no Setor de Floricultura (Horta Velha) da Universidade Federal de Viçosa, localizado a 727 m de altitude, a 20° 50' 22'' de latitude Sul e a 42° 48' 42'' de longitude Oeste. Dois ensaios foram conduzidos, cada um correspondendo a um cultivar.

A casa de vegetação continha 12 canteiros com dimensões de 1,20 x 30 m, com as ruas entre os canteiros de, aproximadamente, 0,70 m. As roseiras, com três anos de idade, estavam plantadas em duas fileiras duplas, com 0,25 m entre fileiras, 0,50 m entre fileiras duplas e 0,25 m entre plantas. Sete canteiros foram cultivados com 'Red Success' e cinco com 'Sônia'.

A fertilização e as aplicações de pesticidas não relacionados ao experimento foram realizadas segundo as práticas adotadas pelos produtores de rosa da região. Fertilizante N:P:K (4:14:8) foi aplicado em cobertura, na proporção de 200g por planta em dezembro de 1999 e repetido a cada dois meses. O inseticida malathion (Malatol 500 CE) e o inseticida/acaricida acephate (Orthene 750 BR) foram aplicados para o controle de ácaros e pulgões, de acordo com a necessidade. Enxofre (Thiovit BR) foi usado para controle do oídio e folpet (Folpet 500PM) e metalaxyl+chlorothalonil (Folio) foram usados para controle do míldio. As plantas foram irrigadas na base, com o uso de mangueiras, uma a três vezes por semana, conforme necessidade. Semanalmente, os botões em ponto de colheita (primeiras sépalas abertas) foram colhidos para comercialização, enquanto aqueles danificados

ou já abertos foram podados e deixados cair sobre os canteiros, os quais foram mantidos com restos culturais, durante todo o ensaio.

Na casa de vegetação utilizada nos experimentos, ocorrem epidemias naturais de *B.cinerea* durante todo o ciclo produtivo da roseira. Em janeiro de 2000, antes da instalação dos tratamentos, quantificou-se a incidência do mofo cinzento em botões e a esporulação do patógeno em restos de cultura em toda a área experimental. Neste período, coletaram-se também, amostras de restos culturais para certificar-se da existência de *C. rosea*, mas nenhum isolado do fungo foi detectado na área experimental.

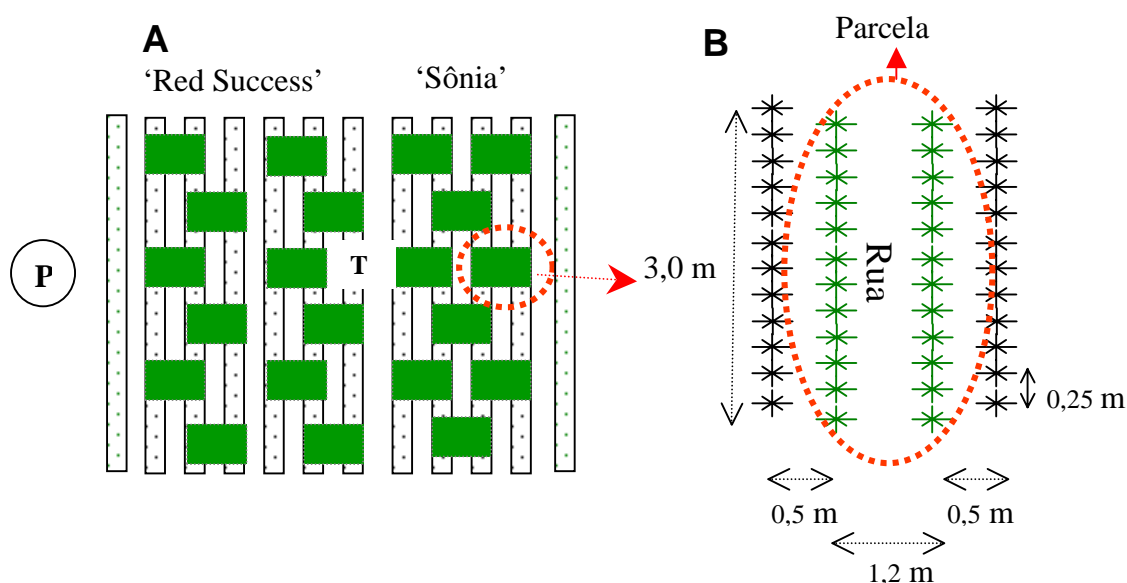
## **2.2. Inóculo de *Botrytis cinerea* e de *Clonostachys rosea***

Nos tratamentos com *C. rosea*, utilizou-se o isolado PG-88-710 (Peng e Sutton, 1991). A produção massal de conídios do antagonista foi realizada conforme protocolo desenvolvido por J. C. Sutton e H. Yu (comunicação pessoal) e modificado por Morandi e Maffia (não publicado). Em grãos de trigo cozidos no vapor por 1h e autoclavados por 30 minutos, aplicaram-se conídios provenientes de cultura pura de *C. rosea* em meio Batata Dextrose Ágar (BDA), na proporção de 10ml de suspensão de inóculo ( $10^7$  esporos/ml) para cada 300g de grãos cozidos. Após 30 dias de incubação a 22°C, os grãos colonizados foram secos lentamente em condição ambiente por 15 dias. Para tal, as tampas dos frascos que continham os grãos foram substituídas por papel poroso ( $75\text{g/m}^2$ ). Após secos, os grãos colonizados foram moídos e peneirados em malha de 1 mm. Obtiveram-se, em média,  $10^9$  conídios por grama de substrato. Para aplicação, via pulverização, ressuspenderam-se 10 g do produto para cada litro de água mais surfactante (Tween 80, 0,5 ml/l água), obtendo-se concentração final de  $10^7$  esporos/ml de *C. rosea*. Nas pulverizações, utilizou-se pulverizador costal e aplicou-se 1 L de calda para  $10\text{m}^2$  de canteiro.

## **2.3. Tratamentos e delineamento experimental**

Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Para ‘Red Success’ estabeleceram-se quatro tratamentos: i. testemunha (Tt); ii. aplicação quinzenal de *C. rosea* (Cr), iii. aplicação semanal do fungicida mancozeb (200 g/100 l) (Mc) e iv. aplicação intercalada, semanalmente, de *C. rosea* e mancozeb (CM). Para ‘Sônia’, estabeleceram-se os mesmos tratamentos,

exceto CM. Cada parcela era constituída por 24 plantas distribuídas ao longo de 3 m de canteiro, abrangendo duas fileiras voltadas para uma rua, de canteiros adjacentes (Figura 1). O espaço entre parcelas adjacentes foi de 1,5 m. Em cada extremidade da casa de vegetação, um canteiro foi mantido como bordadura. As pulverizações, tanto de *C. rosea* quanto de mancozeb, foram direcionadas de forma a cobrir o terço inferior das plantas (aproximadamente 0,70 m do solo) e a superfície do canteiro.



**Figura 1.** Esquema da casa de vegetação com os canteiros e parcelas. (A) distribuição das parcelas nos canteiros, (B) dimensões das parcelas. T = termohigrógrafo, P = pluviômetro.

#### 2.4. Avaliação da esporulação de *Botrytis cinerea* e *Clonostachys rosea* nos restos culturais

Para avaliação da esporulação de *B. cinerea* e *C. rosea* em restos de cultura, coletaram-se amostras de restos na superfície das parcelas em intervalos de 13-15 dias, no período de 27/01 a 31/05/2000, no total de 10 avaliações. Efetuou-se a primeira coleta (27/01) antes do início dos tratamentos. Em cada parcela, coletou-se uma sub-amostra a cada 50 cm de canteiro, perfazendo um total de seis sub-amostras. De cada sub-amostra, composta por 20 a 30 folíolos e, ou, pétalas, retiraram-se 12 discos de 1cm de diâmetro de folha e, ou, pétala, os quais foram transferidos para meio PCA (paraquat-cloranfenicol ágar) em placas de Petri. A porcentagem de discos com esporulação de *B. cinerea* e, ou, de *C. rosea* foi estimada após incubação a  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 h por 7 a 10 dias, com o auxílio de microscópio estereoscópico.

## 2.5. Avaliação da incidência do mofo cinzento em botões de rosa

Avaliou-se a incidência do mofo cinzento em botões de rosa em intervalos de 13 a 15 dias, no período de 25/01 a 10/05/2000, no total de oito avaliações. A primeira avaliação (25/01) foi feita antes do início dos tratamentos. Em cada parcela, avaliaram-se 20 botões no ponto de colheita. Os botões foram colhidos, imediatamente após cada avaliação.

## 2.6. Dados climáticos

A temperatura e a umidade relativa do ar foram registradas durante os experimentos, por meio de um termohigrógrafo colocado no interior de um abrigo meteorológico de madeira no centro da casa de vegetação, a aproximadamente 1,5m da superfície dos canteiros. A precipitação foi monitorada diariamente por meio de um pluviômetro instalado a aproximadamente 3 m da casa de vegetação, sobre um suporte de madeira a 1,10 m do solo .

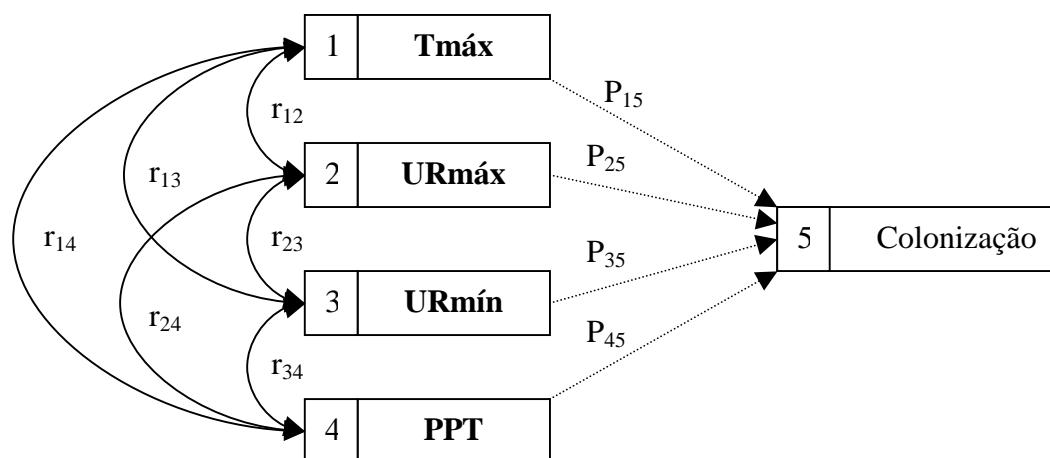
Os valores horários de temperatura e umidade relativa do ar foram usados para cálculo da temperatura e umidade médias diárias, assim como para obtenção da temperatura e umidade máximas e mínimas diárias. Calculou-se também o déficit de pressão de vapor (vpd, em kPa), para cada hora e a média diária, por meio da fórmula:  $vpd=0.6108e^{17.269T/(T+237.3)}(1-UR/100)$ ; onde, T é a temperatura (°C) e UR é a umidade relativa (%) (Snyder e Shaw, 1984).

## 2.7. Análise dos dados

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., Cary, NC). Os dados de esporulação em restos culturais e de incidência de botões doentes foram examinados por análise de variância aninhada (sub-amostra dentro de repetição). Como não houve efeito significativo de sub-amostras na avaliação de esporulação em restos, utilizou-se a média dos seis valores para compor cada repetição. Para cada tratamento, calculou-se a área abaixo da curva de esporulação dos fungos (AACE) nos restos culturais, e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de diferença mínima significativa (Fisher pLSD, Protected Least Significant Difference; Snedecor e Cochran, 1989).

Para quantificar a contribuição das variáveis climáticas na colonização dos restos culturais por *B. cinerea* e *C. rosea*, medida indiretamente pela esporulação dos fungos em discos de tecido em PCA, utilizou-se análise de trilha. As variáveis

climáticas avaliadas foram: temperaturas máxima, média e mínima diárias ( $T_{m\acute{a}x}$ ,  $T_{m\acute{e}d}$  e  $T_{m\acute{i}n}$ , respectivamente), umidades relativas máxima, média e mínima diárias ( $UR_{m\acute{a}x}$ ,  $UR_{m\acute{e}d}$  e  $UR_{m\acute{i}n}$ , respectivamente), precipitação pluviométrica acumulada diariamente (PPT), déficit de pressão de vapor médio diário (VPD), número de horas com  $UR > 90\%$  ( $UR_{90}$ ) e temperatura média durante o período de  $UR > 90\%$  ( $T_{m\acute{e}d90}$ ). Matrizes de correlações entre a esporulação de *B. cinerea* e as variáveis independentes foram geradas para os valores médios da esporulação do patógeno na testemunha ( $T_t$ ), para cada cultivar. Para a esporulação de *C. rosea*, as matrizes foram geradas com os dados de esporulação do fungo no tratamento Cr. Para ambos os fungos, geraram-se as matrizes, correlacionando-se os dados de esporulação com os dados climáticos em defasagem de 1 a 14 dias antes da coleta das amostras ('DEFASG', Cruz, C.D., Departamento de Biologia Geral, Setor de Genética, Universidade Federal de Viçosa). Obtidas as matrizes, diagnosticaram-se possíveis efeitos de multicolinearidade entre as variáveis independentes (Programa 'GENES' - Genética quantitativa e Estatística experimental, vs. 0.1.0, Universidade Federal de Viçosa-MG, <http://www.ufv.br/dbg/home.htm>). Por esta análise, selecionaram-se as variáveis explicativas que permaneceram no modelo (Figura 2) e foram usadas para a análise de trilha (Program 'GENES' vs.0.1.0).



**Figura 2.** Diagrama causal para as relações entre colonização de restos de cultura de rosa por *B. cinerea* e *C. rosea* (medida indiretamente pela esporulação em meio PCA) e as variáveis explicativas selecionadas. As setas pontilhadas indicam efeito direto das variáveis explicativas sobre a variável dependente ( $P_{ij}$ ); as setas sólidas indicam efeitos indiretos ( $r_{ij} \times P_{ij}$ ), onde  $r_{ij}$  representa o coeficiente de correlação entre as variáveis explicativas e  $P_{ij}$  representa o coeficiente de trilha.

Para interpretação dos resultados, foram seguidas as diretrizes propostas por Singh e Chaudary (1979):

1. se o coeficiente de correlação ( $r$ ) entre o fator causal e o efeito é quase igual ao seu efeito direto, a correlação explica a verdadeira relação, e uma seleção direta por meio deste fator será eficiente; e
2. se a correlação é positiva (ou negativa), mas o efeito direto é negativo, positivo ou negligenciável, os efeitos indiretos parecem ser a causa da correlação. Em tais situações, os fatores causais indiretos devem ser considerados simultaneamente.

A seleção da variável climática e o intervalo em que ela mais influenciou a colonização de *B. cinerea* e *C. rosea* basearam-se nos seguintes critérios:

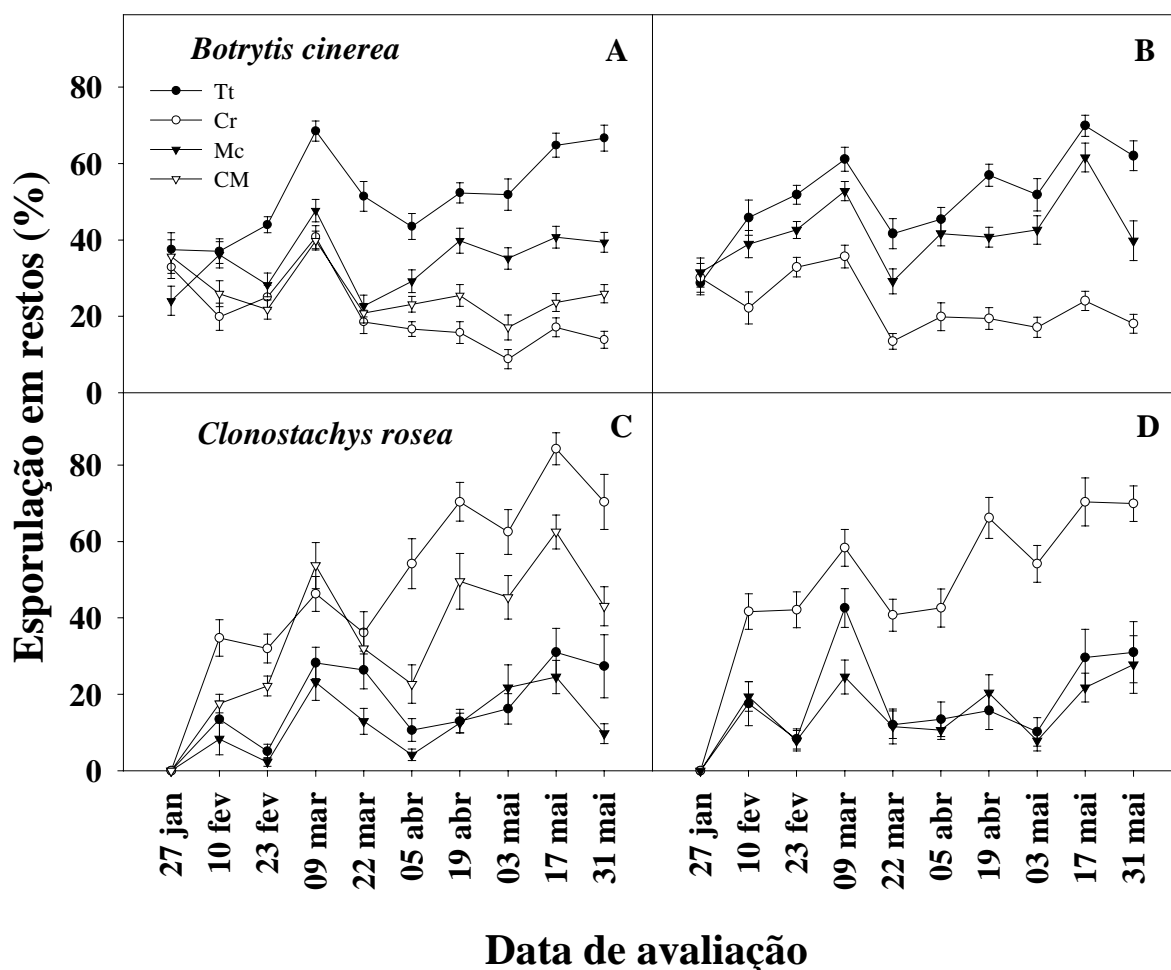
- a. que apresentasse significância nas correlações aos níveis de 0,05 e, preferencialmente, a 0,01 de probabilidade pelo teste t; e
- b. que satisfizesse a primeira diretriz (item 1) mencionada acima.

### 3. RESULTADOS

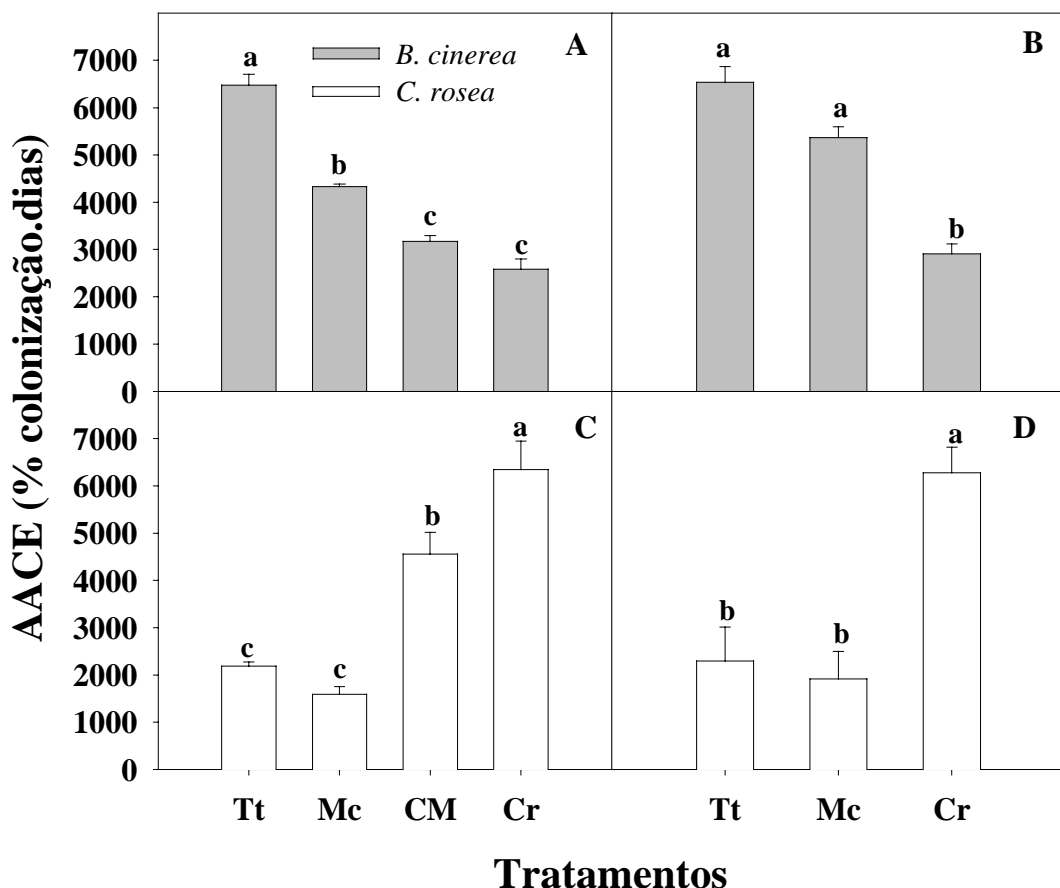
#### 3.1. Esporulação de *Botrytis cinerea* e de *Clonostachys rosea* nos restos culturais

Obtiveram-se os valores percentuais de discos de restos de cultura com esporulação de *B. cinerea* e, ou, *C. rosea* ( Figura 3) e a AACE (Figura 4) para os dois fungos. Tanto para ‘Sônia’ quanto para ‘Red Success’, a esporulação do patógeno foi consistentemente menor nos tratamentos onde se aplicou *C. rosea* (Cr e CM para ‘Red Success’ e Cr para ‘Sônia’). Com a aplicação de mancozeb em combinação com *C. rosea*, ocorreu pequena redução na esporulação do agente ao longo do experimento (Figuras 3C e 4C,D), apesar de não afetar significativamente a redução da esporulação de *B. cinerea* (Figuras 3A e 4A,B). Mancozeb teve efeito intermediário sobre a esporulação de *B. cinerea* para ‘Red Success’ (Figuras 3A e 4A), mas não diferiu da testemunha para ‘Sônia’ (Figuras 3B e 4B). Nas parcelas da testemunha e do tratamento com mancozeb, verificou-se a presença esporádica e em baixo nível de *C.*

*rosea* (Figura 3C,D). Como antes do início dos experimentos o fungo não foi detectado na área experimental, este efeito foi atribuído à contaminação destas parcelas por conídios oriundos das parcelas tratadas com *C. rosea*.



**Figura 3.** Porcentagem de discos com esporulação de *Botrytis cinerea* e *Clonostachys rosea* em discos de folhas e pétalas retirados em intervalos de 13 a 15 dias de restos culturais de roseira onde foi aplicado *C. rosea* a cada 15 dias (Cr); mancozeb a cada 7 dias (Mc); *C. rosea* + mancozeb, intercalados a cada 7 dias (CM); ou água apenas a cada 7 dias (Tt, testemunha). (A) e (B): *B. cinerea* nos cultivares Red Success e Sônia, respectivamente; (C) e (D): *C. rosea* nos cultivares Red Success e Sônia, respectivamente. O tratamento CM não foi incluído na variedade Sônia. As curvas mostram valores médios com barras de erro padrão.



**Figura 4.** Área abaixo da curva de esporulação (AACE) de *Botrytis cinerea* e *Clonostachys rosea* em restos culturais de roseira onde foi aplicado *C. rosea* a cada 15 dias (Cr); mancozeb a cada 7 dias (Mc); *C. rosea* + mancozeb, intercalados a cada 7 dias (CM); ou água apenas a cada 7 dias (Tt, testemunha). (A) e (B): AACE de *B. cinerea* nos cultivares Red Success e Sônia, respectivamente; (C) e (D): AACE de *C. rosea* nos cultivares Red Success e Sônia, respectivamente. O tratamento CM não foi incluído na variedade Sônia. As barras são valores médios cada uma com erro padrão. Médias de tratamentos para *C. rosea* ou *B. cinerea*, em dado cultivar, seguidas pela mesma letra não diferem significativamente (Fisher pLSD,  $P \leq 0.05$ ).

### 3.2. Incidência do mofo cinzento em botões de rosa

A incidência do mofo cinzento em botões de rosa nas parcelas, antes do início dos tratamentos, variou de (62 a 100%) para ambos os cultivares. Para 'Red Success', os tratamentos com *C. rosea* (Cr e CM) reduziram significativamente (Fisher pLSD,  $P \leq 0,05$ ) a incidência da doença em cinco das oito avaliações realizadas (09/02; 23/02; 22/03; 05/04 e 20/04). Mancozeb foi eficiente em apenas três avaliações

(23/02; 22/03 e 20/04). Para ‘Sônia’, *C. rosea* reduziu significativamente a incidência da doença em apenas duas avaliações (05/04 e 20/04) e mancozeb não foi eficiente em quaisquer delas. Entretanto, em nenhum caso a redução na incidência da doença em botões foi superior a 25% (Tabela 1).

**Tabela 1.** Incidência do mofo cinzento em botões (%) para os cultivares Red Success e Sônia em diferentes datas de avaliações. Tt = testemunha; Cr = aplicação quinzenal de *Clonostachys rosea*; Mc = aplicação semanal de mancozeb; e, CM = aplicação intercalada semanalmente de *C. rosea* e mancozeb. \*Valores significativos, em relação à testemunha na mesma data (Fisher pLSD,  $P \leq 0,05$ ).

Data	‘Red Success’				‘Sônia’		
	Tt	Cr	Mc	CM	Tt	Cr	Mc
25/01	72,0	73,1	80,9	81,9	81,8	79,7	81,5
09/02	86,7	75,0*	83,3	70,0*	70,0	76,7	71,7
23/02	96,7	81,7*	83,3*	85,0*	98,3	91,7	88,3
07/03	91,1	82,0	88,9	85,2	93,3	81,7	83,3
22/03	93,3	75,0*	86,7*	81,7*	91,7	78,3	81,7
05/04	93,3	81,7*	91,7	80,0*	93,3	76,7*	86,7
20/04	91,7	80,0*	81,7*	78,3*	95,0	68,3*	85,0
10/05	93,3	81,7	91,7	85,0	96,7	81,7	95,0

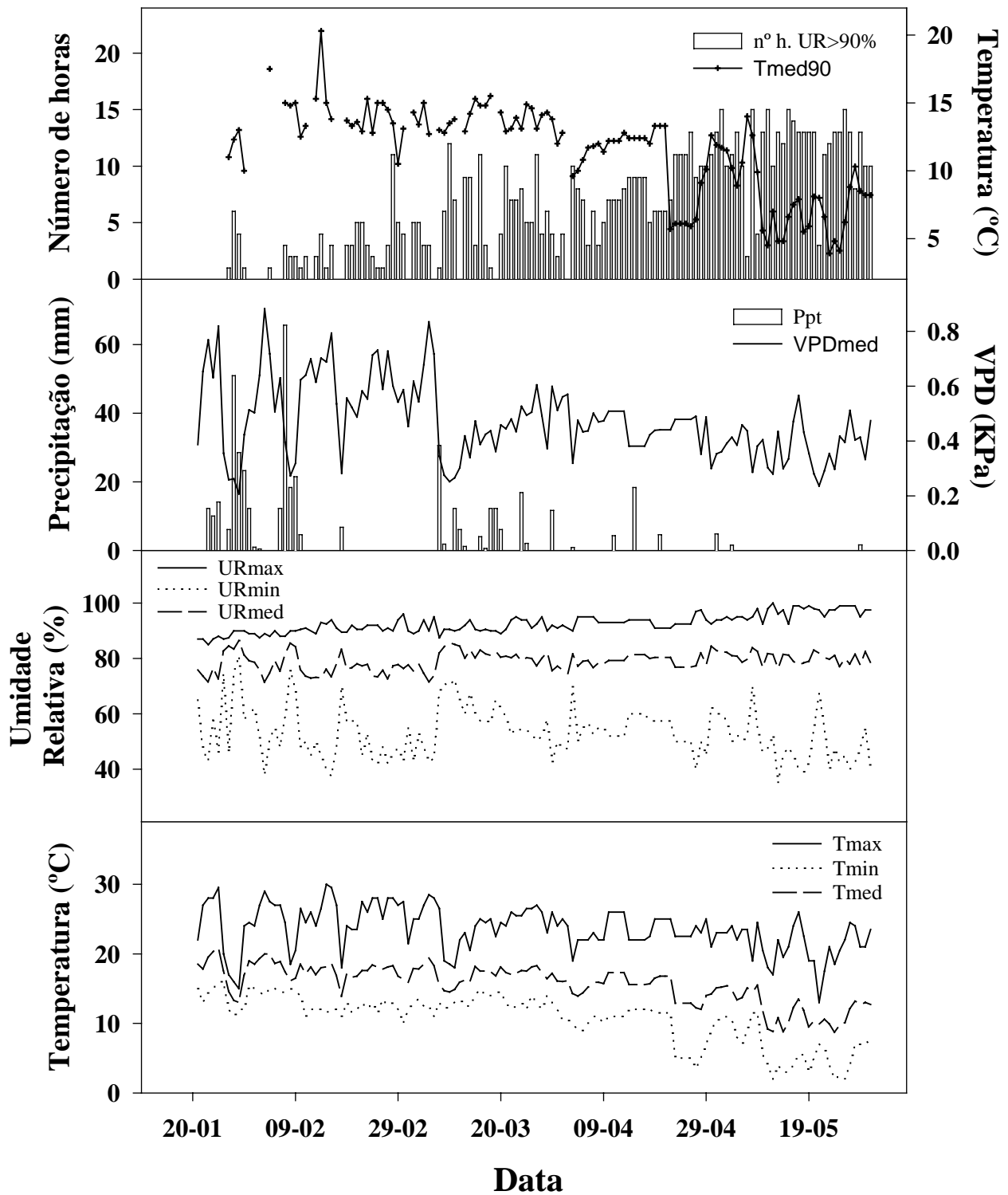
### 3.3. Efeitos das variáveis climáticas sobre a colonização de restos por *Botrytis cinerea* e *Clonostachys rosea*

Com base no diagrama causal (Figura 2), obtiveram-se as estimativas dos efeitos diretos e indiretos das variáveis climáticas (variáveis explicativas) (Tabelas 2 a 5) sobre a colonização de restos culturais de roseira por *B. cinerea* e *C. rosea* (variável básica), medida indiretamente pela esporulação dos fungos nos discos em meio PCA. Para os dois fungos, nas duas cultivares utilizadas nos ensaios, o conjunto destas variáveis foi satisfatório para explicar as variações na esporulação dos fungos, pois o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi, para as defasagens até 10 dias antes das avaliações, superior a 0,5, mais frequentemente acima de 0,8.

No intervalo de 1 a 5 dias de defasagem, URmáx foi a variável que melhor explicou as causas de variações na colonização de *B. cinerea*, em ambas as cultivares,

pois apresentou alto efeito direto positivo sobre a variável básica com o mesmo sinal da correlação e magnitude, em alguns casos, mais de três vezes superior ao efeito residual ( $1-R^2$ ). No intervalo de 6 a 7 dias de defasagem, as variáveis  $T_{\text{máx}}$  e  $UR_{\text{mín}}$  apresentaram alto efeito direto negativo sobre a esporulação de *B. cinerea*. Entretanto, no intervalo de 8 a 10 dias de defasagem, a variável  $UR_{\text{máx}}$  voltou a ser a causa principal da variação na esporulação do patógeno (Tabelas 2 e 3).

Para *C. rosea*, a variável  $UR_{\text{máx}}$  foi suficiente para explicar as variações na esporulação do fungo no intervalo de 1 a 10 dias de defasagem, em ambas as cultivares, com a exceção dos dias 7 e 8, onde os efeitos indiretos via  $T_{\text{máx}}$ ,  $UR_{\text{mín}}$  e PPT, considerados simultaneamente, foram mais importantes para se explicar a variação na esporulação do fungo (Tabelas 4 e 5).



**Figura 5.** Variáveis climáticas registradas na casa de vegetação onde se conduziram os experimentos, no período de 21/01 a 31/05/00. UR90 = número de horas de umidade relativa >90%; Tmed90 = temperatura média durante o período de UR>90%; Ppt = precipitação em mm/dia; VPDmed = déficit de pressão de vapor médio diário (KPa); URmax, URmin e URmed = umidade relativa máxima, mínima e média diárias, respectivamente (%); Tmax, Tmin e Tmed = temperatura máxima, mínima e média diárias, respectivamente (°C).

**Tabela 2.** Coeficientes de trilha dos efeitos das variáveis climáticas sobre a colonização dos restos culturais de roseira cv.Red Success por *Botrytis cinerea*.

Descrição dos efeitos	Número de dias de defasagem das variáveis climáticas em relação ao dia da coleta das amostras									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Direto de T <sub>máx</sub>	1,2524	-0,2321	0,1384	0,2078	-0,4705	-0,6064	-0,8472	-0,2271	-0,0578	0,3698
Indireto via UR <sub>máx</sub>	-0,2333	-0,0462	-0,3237	-0,5836	-0,1477	0,1068	-0,0367	-0,2570	-0,4034	-0,7056
via UR <sub>mín</sub>	-0,6565	0,3661	0,0605	-0,0008	0,0341	0,0020	0,0583	0,1175	-0,0106	0,0439
via PPT	0,0005	-0,009	-0,0259	0,0003	0,1710	0,0531	0,0005	0,0165	-0,0070	-0,0159
<i>Total (correlação)</i>	<i>0,3631<sup>ns</sup></i>	<i>0,0784<sup>ns</sup></i>	<i>-0,1508<sup>ns</sup></i>	<i>-0,3763<sup>ns</sup></i>	<i>-0,4132<sup>ns</sup></i>	<i>-0,5506<sup>ns</sup></i>	<i>-0,8250<sup>**</sup></i>	<i>-0,3501<sup>ns</sup></i>	<i>-0,4789<sup>ns</sup></i>	<i>-0,3077<sup>ns</sup></i>
Direto de UR <sub>máx</sub>	1,6794	0,4690	0,5456	0,9859	0,2543	-0,1765	0,1038	0,7455	1,0155	0,8756
Indireto via T <sub>máx</sub>	-0,1740	0,0228	-0,0821	-0,1230	0,2732	0,3672	0,2994	0,0783	0,0229	-0,2979
via UR <sub>mín</sub>	-1,0628	0,2050	0,1511	-0,0021	0,0251	0,3953	0,0301	0,0313	-0,0008	-0,0243
via PPT	-0,0012	0,1028	0,0861	-0,0019	0,0948	0,0209	-0,0072	-0,0233	-0,1892	0,0731
<i>Total (correlação)</i>	<i>0,4415<sup>ns</sup></i>	<i>0,7997<sup>**</sup></i>	<i>0,7006<sup>*</sup></i>	<i>0,8589<sup>**</sup></i>	<i>0,6475<sup>*</sup></i>	<i>0,6069<sup>ns</sup></i>	<i>0,4261<sup>ns</sup></i>	<i>0,8318<sup>**</sup></i>	<i>0,8484<sup>**</sup></i>	<i>0,6266<sup>ns</sup></i>
Direto de UR <sub>mín</sub>	1,4878	-0,5430	-0,3005	0,0066	0,0806	-0,6504	-0,1172	-0,2538	0,0167	-0,0590
Indireto via T <sub>máx</sub>	-0,5526	0,1565	-0,0278	-0,0245	0,1990	0,0018	0,4213	0,1052	0,0368	-0,2751
via UR <sub>máx</sub>	-1,1996	-0,1771	-0,2742	-0,3192	-0,0792	0,1073	-0,0267	-0,0919	-0,0514	0,3599
via PPT	0,0012	-0,0651	-0,0561	0,0020	-0,2703	0,0325	0,0156	0,0101	0,1204	-0,0743
<i>Total (correlação)</i>	<i>-0,2632<sup>ns</sup></i>	<i>-0,6287<sup>ns</sup></i>	<i>-0,6587<sup>*</sup></i>	<i>-0,3351<sup>ns</sup></i>	<i>-0,2312<sup>ns</sup></i>	<i>-0,5088<sup>ns</sup></i>	<i>0,2930<sup>ns</sup></i>	<i>-0,2305<sup>ns</sup></i>	<i>0,1225<sup>ns</sup></i>	<i>-0,0485<sup>ns</sup></i>
Direto de PPT	0,0023	-0,1774	-0,1769	0,0039	-0,3389	-0,2125	0,0311	0,1124	0,2721	-0,1625
Indireto via T <sub>máx</sub>	0,2437	-0,0123	0,0203	0,0141	0,2373	-0,1515	-0,0142	-0,0333	0,0015	0,0361
via UR <sub>máx</sub>	-0,8517	-0,2719	-0,2655	-0,4759	-0,0711	0,0174	-0,0239	-0,1543	-0,7062	-0,3940
via UR <sub>mín</sub>	0,7742	-0,1992	-0,0953	0,0033	-0,0643	0,0994	-0,0586	-0,0228	0,0074	-0,0270
<i>Total (correlação)</i>	<i>0,1685<sup>ns</sup></i>	<i>-0,6608<sup>*</sup></i>	<i>-0,5174<sup>ns</sup></i>	<i>-0,4547<sup>ns</sup></i>	<i>-0,2369<sup>ns</sup></i>	<i>-0,2472<sup>ns</sup></i>	<i>-0,0656<sup>ns</sup></i>	<i>-0,0981<sup>ns</sup></i>	<i>-0,4253<sup>ns</sup></i>	<i>-0,5475<sup>ns</sup></i>
Efeito residual	0,4417	0,4296	0,5909	0,4851	0,7362	0,6243	0,5415	0,5029	0,4737	0,6879
Coefficiente de determinação	0,8049	0,8154	0,6501	0,7646	0,4580	0,6102	0,7068	0,7471	0,7756	0,5267

<sup>ns</sup>, \* e \*\* = não-significativo e significativos aos níveis de 0,05 e 0,01 de probabilidade, respectivamente, pelo teste t;

T<sub>máx</sub> = temperatura máxima diária, em °C; UR<sub>máx</sub> = umidade relativa máxima diária, em %; UR<sub>mín</sub> = umidade relativa mínima diária, em %; e PPT = precipitação pluvial diária, em mm.

**Tabela 3.** Coeficientes de trilha dos efeitos das variáveis climáticas sobre a colonização dos restos culturais de roseira cv.Sônia por *Botrytis cinerea*.

Descrição dos efeitos	Número de dias de defasagem das variáveis climáticas em relação ao dia da coleta das amostras									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Direto de T <sub>máx</sub>	0,7598	-0,5968	-0,3044	-0,2592	-0,4220	-0,1952	-0,7045	0,0733	0,0036	-0,0863
Indireto via UR <sub>máx</sub>	-0,1846	-0,0448	-0,2416	-0,3787	-0,2953	-0,1075	-0,0301	-0,2381	-0,1629	-0,8678
via UR <sub>mín</sub>	-0,2376	0,3161	0,0998	0,0025	-0,1317	0,0019	0,1840	0,1540	-0,3226	0,6908
via PPT	0,0759	-0,0111	0,0101	-0,0093	0,1695	-0,0763	-0,0048	0,0354	0,0151	0,3555
<i>Total (correlação)</i>	<i>0,4134<sup>ns</sup></i>	<i>-0,3365<sup>ns</sup></i>	<i>-0,4361<sup>ns</sup></i>	<i>-0,6448*</i>	<i>-0,6795*</i>	<i>-0,3771<sup>ns</sup></i>	<i>-0,5554<sup>ns</sup></i>	<i>0,02462<sup>ns</sup></i>	<i>-0,4668<sup>ns</sup></i>	<i>-0,2278<sup>ns</sup></i>
Direto de UR <sub>máx</sub>	1,3290	0,4549	0,4072	0,6398	0,5086	0,1775	0,0852	0,6906	0,4099	1,0770
Indireto via T <sub>máx</sub>	-0,1055	0,0587	0,1806	0,1534	0,2451	0,1182	0,2489	-0,0253	-0,0014	0,0696
via UR <sub>mín</sub>	-0,3847	0,1770	0,2495	0,0069	-0,0969	0,3744	0,0951	0,0410	-0,0256	-0,3817
via PPT	-0,1977	0,1209	-0,0336	0,0668	0,0939	0,0301	0,0664	-0,0499	0,4048	-0,1638
<i>Total (correlação)</i>	<i>0,6411*</i>	<i>0,8116**</i>	<i>0,8038**</i>	<i>0,8671**</i>	<i>0,7506*</i>	<i>0,700*</i>	<i>0,4957<sup>ns</sup></i>	<i>0,6564*</i>	<i>0,7877**</i>	<i>0,6011</i>
Direto de UR <sub>mín</sub>	0,5385	-0,4689	-0,4963	-0,0214	0,3113	-0,6160	-0,3700	-0,3326	0,5065	-0,9284
Indireto via T <sub>máx</sub>	-0,3353	0,4024	0,0613	0,0305	0,1785	0,0006	0,3503	-0,0339	-0,0023	0,0642
via UR <sub>máx</sub>	-0,9493	-0,1717	-0,2047	-0,2072	-0,1584	-0,1079	-0,0219	-0,0851	-0,0208	0,4427
via PPT	0,2029	-0,0766	-0,0219	-0,0700	-0,2680	0,0467	-0,1439	0,0217	-0,2577	0,1665
<i>Total (correlação)</i>	<i>-0,5432<sup>ns</sup></i>	<i>-0,3148<sup>ns</sup></i>	<i>-0,6179<sup>ns</sup></i>	<i>-0,2681<sup>ns</sup></i>	<i>0,0634<sup>ns</sup></i>	<i>-0,6767*</i>	<i>-0,1855<sup>ns</sup></i>	<i>-0,4300<sup>ns</sup></i>	<i>0,2258<sup>ns</sup></i>	<i>-0,2550<sup>ns</sup></i>
Direto de PPT	0,3899	-0,2087	0,0690	-0,1385	-0,3360	-0,3055	-0,2877	0,2414	-0,5821	0,3641
Indireto via T <sub>máx</sub>	0,1478	-0,0316	-0,0447	-0,0176	0,2129	-0,0488	-0,0118	0,0108	-0,0001	-0,0084
via UR <sub>máx</sub>	-0,6740	-0,2637	-0,1982	-0,3089	-0,1422	-0,0175	-0,0197	-0,1429	-0,2851	-0,4846
via UR <sub>mín</sub>	0,2802	-0,1720	-0,1575	-0,0108	0,2483	0,0942	-0,1851	0,0299	0,2242	-0,4245
<i>Total (correlação)</i>	<i>0,1439<sup>ns</sup></i>	<i>-0,6760*</i>	<i>-0,3313<sup>ns</sup></i>	<i>-0,4758<sup>ns</sup></i>	<i>-0,0169<sup>ns</sup></i>	<i>-0,2775<sup>ns</sup></i>	<i>-0,5043<sup>ns</sup></i>	<i>0,0794<sup>ns</sup></i>	<i>-0,6431*</i>	<i>-0,5535<sup>ns</sup></i>
Efeito residual	0,2650	0,3758	0,5061	0,4543	0,5532	0,5482	0,5939	0,6186	0,4359	0,5457
Coefficiente de determinação	0,9298	0,8588	0,7439	0,7936	0,6940	0,6995	0,6472	0,6173	0,8099	0,7022

<sup>ns</sup>, \* e \*\* = não-significativo e significativos aos níveis de 0,05 e 0,01 de probabilidade, respectivamente, pelo teste t;

T<sub>máx</sub> = temperatura máxima diária, em °C; UR<sub>máx</sub> = umidade relativa máxima diária, em %; UR<sub>mín</sub> = umidade relativa mínima diária, em %; e PPT = precipitação pluvial diária, em mm.

**Tabela 4.** Coeficientes de trilha dos efeitos das variáveis climáticas sobre a colonização dos restos culturais de roseira cv.Red Success por *Clonostachys rosea*.

Descrição dos efeitos	Número de dias de defasagem das variáveis climáticas em relação ao dia da coleta das amostras									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Direto de T <sub>máx</sub>	0,5389	-0,6881	-0,6132	-0,4019	-0,2767	0,0991	-0,5346	-0,3027	-0,2074	0,6291
Indireto via UR <sub>máx</sub>	-0,2014	-0,0405	-0,1613	-0,3930	-0,4106	-0,4825	-0,0778	-0,2033	-0,0134	-1,2562
via UR <sub>mín</sub>	-0,2595	0,1725	0,0858	0,0139	-0,1806	0,0006	-0,0569	-0,0709	-0,3709	0,2235
via PPT	0,0323	-0,0143	0,0010	0,0048	0,2753	0,0085	-0,0062	-0,0670	0,0212	0,0220
<i>Total (correlação)</i>	<i>0,1102<sup>ns</sup></i>	<i>-0,5704<sup>ns</sup></i>	<i>-0,6878*</i>	<i>-0,7763**</i>	<i>-0,5925<sup>ns</sup></i>	<i>-0,3744<sup>ns</sup></i>	<i>-0,6755*</i>	<i>-0,3681<sup>ns</sup></i>	<i>-0,5705<sup>ns</sup></i>	<i>-0,3817<sup>ns</sup></i>
Direto de UR <sub>máx</sub>	1,4501	0,4112	0,2719	0,6640	0,7070	0,7969	0,2201	0,5897	0,0336	1,5590
Indireto via T <sub>máx</sub>	-0,0749	0,0677	0,3639	0,2379	0,1607	-0,0599	0,1889	0,1044	0,0824	-0,5069
via UR <sub>mín</sub>	-0,4201	0,0966	0,2143	0,0381	-0,1329	0,1157	-0,0294	0,0189	-0,0295	-0,1235
via PPT	-0,0841	0,1568	-0,0032	-0,0342	0,1526	-0,0033	0,0852	-0,0945	0,5685	-0,1013
<i>Total (correlação)</i>	<i>0,8710**</i>	<i>0,7323*</i>	<i>0,8468**</i>	<i>0,9059**</i>	<i>0,8874**</i>	<i>0,8493**</i>	<i>0,4648<sup>ns</sup></i>	<i>0,6185<sup>ns</sup></i>	<i>0,6551*</i>	<i>0,8274**</i>
Direto de UR <sub>mín</sub>	0,5881	-0,2559	-0,4263	-0,1178	0,4269	-0,1903	0,1144	-0,1532	0,5822	-0,3003
Indireto via T <sub>máx</sub>	-0,2378	0,4639	0,1234	0,0473	0,1170	-0,0003	0,2659	0,1402	0,1321	-0,4680
via UR <sub>máx</sub>	-1,0358	-0,1552	-0,1367	-0,2150	-0,2201	-0,4844	-0,0566	-0,0727	-0,0017	0,6409
via PPT	0,0863	-0,0992	0,0021	0,0358	-0,4354	-0,0052	-0,1848	0,0409	-0,3619	0,1029
<i>Total (correlação)</i>	<i>-0,5992<sup>ns</sup></i>	<i>-0,0465<sup>ns</sup></i>	<i>-0,4375<sup>ns</sup></i>	<i>-0,2496<sup>ns</sup></i>	<i>-0,1115<sup>ns</sup></i>	<i>-0,6802*</i>	<i>0,1389<sup>ns</sup></i>	<i>-0,0448<sup>ns</sup></i>	<i>0,3507<sup>ns</sup></i>	<i>-0,0245<sup>ns</sup></i>
Direto de PPT	0,1658	-0,2705	0,0066	0,0709	-0,5458	0,0338	-0,3694	0,4566	-0,8175	0,2251
Indireto via T <sub>máx</sub>	0,1048	-0,0365	-0,0899	-0,0273	0,1396	0,0247	-0,0089	-0,0444	0,0054	0,0614
via UR <sub>máx</sub>	-0,7354	-0,2383	-0,1323	-0,3206	-0,1977	-0,0784	-0,0508	-0,1221	-0,0234	-0,7015
via UR <sub>mín</sub>	0,3061	-0,0939	-0,1353	-0,0596	0,3406	0,0291	0,0572	-0,0138	0,2577	-0,1373
<i>Total (correlação)</i>	<i>-0,1587<sup>ns</sup></i>	<i>-0,6392*</i>	<i>-0,3509<sup>ns</sup></i>	<i>-0,3366<sup>ns</sup></i>	<i>-0,2633<sup>ns</sup></i>	<i>0,0093<sup>ns</sup></i>	<i>-0,3719<sup>ns</sup></i>	<i>0,2764<sup>ns</sup></i>	<i>-0,5778<sup>ns</sup></i>	<i>-0,5523<sup>ns</sup></i>
Efeito residual	0,2373	0,3488	0,4047	0,2845	0,3355	0,4802	0,6191	0,6251	0,4279	0,2591
Coefficiente de determinação	0,9437	0,8784	0,8363	0,9191	0,8874	0,7695	0,6167	0,6093	0,8169	0,9329

<sup>ns</sup>, \* e \*\* = não-significativo e significativos aos níveis de 0,05 e 0,01 de probabilidade, respectivamente, pelo teste t;

T<sub>máx</sub> = temperatura máxima diária, em °C; UR<sub>máx</sub> = umidade relativa máxima diária, em %; UR<sub>mín</sub> = umidade relativa mínima diária, em %; e PPT = precipitação pluvial diária, em mm.

**Tabela 5.** Coeficientes de trilha dos efeitos das variáveis climáticas sobre a colonização dos restos culturais de roseira cv.Sônia por *Clonostachys rosea*.

Descrição dos efeitos	Número de dias de defasagem das variáveis climáticas em relação ao dia da coleta das amostras									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Direto de T <sub>máx</sub>	0,6666	-0,4861	-0,2999	-0,1607	0,0945	0,1909	-0,5528	-0,3339	-0,2365	0,0630
Indireto via UR <sub>máx</sub>	-0,1902	-0,0593	-0,3226	-0,5194	-0,5503	-0,3666	-0,1105	-0,1980	-0,1252	-1,0214
via UR <sub>mín</sub>	-0,2484	0,0649	0,0577	-0,0187	-0,2773	0,0011	0,0149	0,1900	-0,2126	0,4641
via PPT	0,0667	-0,0128	0,0190	0,0016	0,1676	-0,0472	-0,0049	0,0772	0,0131	0,0313
<i>Total (correlação)</i>	<i>0,2946<sup>ns</sup></i>	<i>-0,4931<sup>ns</sup></i>	<i>-0,5457<sup>ns</sup></i>	<i>-0,6972*</i>	<i>-0,5654<sup>ns</sup></i>	<i>-0,2217<sup>ns</sup></i>	<i>-0,6533*</i>	<i>-0,2648<sup>ns</sup></i>	<i>-0,5612<sup>ns</sup></i>	<i>-0,4629<sup>ns</sup></i>
Direto de UR <sub>máx</sub>	1,3694	0,6021	0,5436	0,8776	0,9476	0,6054	0,3127	0,5745	0,3151	1,2676
Indireto via T <sub>máx</sub>	-0,0926	0,0478	0,1779	0,0951	-0,0549	-0,1156	0,1954	0,1151	0,0940	-0,0507
via UR <sub>mín</sub>	-0,4022	0,0364	0,1442	-0,0513	-0,2042	0,2259	0,0078	0,0506	-0,0169	-0,2565
via PPT	-0,1738	0,1398	-0,0632	-0,0114	0,0929	0,0186	0,0682	-0,1088	0,3516	-0,1443
<i>Total (correlação)</i>	<i>0,7008*</i>	<i>0,8261**</i>	<i>0,8026**</i>	<i>0,9099**</i>	<i>0,7815**</i>	<i>0,7342*</i>	<i>0,5840<sup>ns</sup></i>	<i>0,6314*</i>	<i>0,7437*</i>	<i>0,8161**</i>
Direto de UR <sub>mín</sub>	0,5631	-0,0964	-0,2869	0,1584	0,6557	-0,3716	-0,0301	-0,4104	0,3337	-0,6238
Indireto via T <sub>máx</sub>	-0,2941	0,3277	0,0603	0,0189	-0,0399	-0,0006	0,2749	0,1546	0,1507	-0,0468
via UR <sub>máx</sub>	-0,9782	-0,2273	-0,2732	-0,2841	-0,2951	-0,3680	-0,0804	-0,0708	-0,0159	0,5211
via PPT	0,1783	-0,0885	0,0412	0,0119	-0,2651	0,0289	-0,1480	0,0472	-0,2238	0,1466
<i>Total (correlação)</i>	<i>0,5309<sup>ns</sup></i>	<i>-0,0844<sup>ns</sup></i>	<i>-0,4586<sup>ns</sup></i>	<i>-0,0948<sup>ns</sup></i>	<i>0,0556<sup>ns</sup></i>	<i>-0,7113*</i>	<i>0,0164<sup>ns</sup></i>	<i>-0,2795<sup>ns</sup></i>	<i>0,2446<sup>ns</sup></i>	<i>-0,0029<sup>ns</sup></i>
Direto de PPT	0,3427	-0,2412	0,1298	0,0237	-0,3323	-0,1889	-0,2958	0,5258	-0,5056	0,3207
Indireto via T <sub>máx</sub>	0,1297	-0,0258	-0,0440	-0,0109	-0,0477	0,0477	-0,0093	-0,0490	0,0061	0,0061
via UR <sub>máx</sub>	-0,6945	-0,3490	-0,2646	-0,4237	-0,2650	-0,0596	-0,0721	-0,1189	-0,2191	-0,5704
via UR <sub>mín</sub>	0,2930	-0,0353	-0,0910	0,0801	0,5230	0,0568	-0,0151	-0,0368	0,1477	-0,2852
<i>Total (correlação)</i>	<i>0,0709<sup>ns</sup></i>	<i>-0,6513*</i>	<i>-0,2697<sup>ns</sup></i>	<i>-0,3307<sup>ns</sup></i>	<i>-0,1219<sup>ns</sup></i>	<i>-0,1439<sup>ns</sup></i>	<i>-0,3923<sup>ns</sup></i>	<i>0,3211<sup>ns</sup></i>	<i>-0,5708<sup>ns</sup></i>	<i>-0,5288<sup>ns</sup></i>
Efeito residual	0,3444	0,3127	0,5509	0,3351	0,4858	0,5535	0,5837	0,5151	0,5125	0,4030
Coefficiente de determinação	0,8814	0,9022	0,6965	0,8877	0,7640	0,6936	0,6593	0,7347	0,7373	0,8376

<sup>ns</sup>, \* e \*\* = não-significativo e significativos aos níveis de 0,05 e 0,01 de probabilidade, respectivamente, pelo teste t;

T<sub>máx</sub> = temperatura máxima diária, em °C; UR<sub>máx</sub> = umidade relativa máxima diária, em %; UR<sub>mín</sub> = umidade relativa mínima diária, em %; e PPT = precipitação pluvial diária, em mm.

#### 4. DISCUSSÃO

Patógenos necrotróficos não especializados, como *B. cinerea*, infectam tecidos saudáveis de plantas, porém, o crescimento micelial e a esporulação só ocorrem após a senescência dos tecidos (Köhl et al, 1995b). Os restos culturais de roseira constituem a principal fonte de inóculo de *B. cinerea* no interior de casas de vegetação (Araújo, 1995; Monteiro, 1996). Portanto, considerando-se que o progresso da epidemia do mofo cinzento no sistema produtivo de rosas depende do inóculo produzido dentro da própria casa de vegetação e que há pouca contribuição de esporos trazidos de fora pelo ar, é válido adotar medida(s) de manejo que promova(m) a redução do crescimento saprofítico e, conseqüentemente, da esporulação do patógeno nos restos culturais.

A eficiência de *C. rosea* em controlar o patógeno nos restos culturais está diretamente relacionada à habilidade do antagonista em colonizar os tecidos senescentes mais rapidamente que o patógeno (Morandi et al., 2000a; Morandi et al., 2001). Neste sentido, fatores como o estágio de desenvolvimento de folhas e pétalas quando da aplicação dos esporos do antagonista; a comunidade microbiana associada a estes tecidos e as condições climáticas predominantes durante os eventos da colonização determinam a eficiência de *C. rosea* (Sutton et al., 1997; Yu e Sutton, 1997; Morandi et al. 2001). No presente estudo, *C. rosea* estabeleceu-se eficientemente nos restos culturais de roseira, o que foi evidenciado pelo incremento na esporulação do fungo nas avaliações sucessivas, pelo alto valor de AACE de *C. rosea* ao final do experimento e pela redução crescente na esporulação de *B. cinerea* nos tratamentos onde o agente foi aplicado.

Outra evidência do sucesso no estabelecimento de *C. rosea* nos restos culturais de roseira foi a recuperação do fungo de parcelas onde este não foi aplicado. Antes do início do experimento, *C. rosea* não foi detectado na área; assim é possível considerar que o crescimento do fungo nos discos de folhas das parcelas da testemunha e do tratamento com mancozeb era do isolado utilizado nos estudos. A contaminação destas parcelas pode ter ocorrido por deriva durante a aplicação, o que, entretanto, não parece ser a causa principal, pois se utilizou um pulverizador de baixa pressão, com pequeno volume de calda e com jato direcionado para a base do canteiro. É mais provável que a contaminação tenha sido pelo transporte de conídios de *C. rosea*

produzidos nos próprios restos culturais, após sua colonização, por meio da água de irrigação. Um fato que reforça esta hipótese é que a contaminação ocorreu, primeira e preferencialmente, nas parcelas localizadas próximo às que receberam aplicação de *C. rosea* e no sentido do declive do terreno.

A redução na esporulação do patógeno não resultou em redução significativa na incidência da doença em vista, principalmente, de três fatores: i- o tratamento com *C. rosea* iniciou-se no final de janeiro, quando a epidemia do mofo cinzento já estava em estágio avançado; ii- não se realizaram quaisquer práticas de saneamento ao longo do experimento; e iii- nem todas as plantas da casa de vegetação foram tratadas com *C. rosea*, o que permitiu a multiplicação do patógeno nos espaços entre as parcelas. Entretanto, pelos resultados de redução da esporulação de *B. cinerea* por *C. rosea*, mesmo em condições extremamente favoráveis ao patógeno, espera-se que o uso continuado do antagonista ao longo de vários ciclos produtivos de rosa, possa reduzir substancialmente a população de *B. cinerea* no interior das casas de vegetação e, com isso, proporcionar significativa redução na incidência de botões doentes.

Em plantas de 'Sônia', a redução da esporulação de *B. cinerea* por mancozeb foi pequena e não diferiu da testemunha. Para 'Red Success', o efeito do tratamento com mancozeb foi ligeiramente superior ao da testemunha, porém inferior ao dos tratamentos com *C. rosea*. Estes resultados estão de acordo com o relato de Monteiro (1996), em que o fungicida só foi eficiente no controle do patógeno sob condições de baixa pressão de inóculo, e não em estádios mais avançados da epidemia. O uso de mancozeb intercalado ao tratamento com *C. rosea* não foi mais eficiente em reduzir a esporulação do patógeno, que o agente de biocontrole apenas. Este resultado foi devido, provavelmente, à pequena redução no crescimento de *C. rosea* observada neste tratamento, o que está de acordo com observações anteriores (Morandi, 1997) de que mancozeb reduziu parcialmente o crescimento micelial e esporulação de *C. rosea in vitro*.

Os restos culturais no interior da casa de vegetação estiveram sujeitos a ciclos de umedecimento e secagem diários. Os restos permaneceram umedecidos nos períodos de maior umidade relativa do ar (UR), em geral entre 17:00 e 09:00 horas e secos durante os períodos de baixa UR, em geral, entre 10:00 e 16:00 horas. O estabelecimento de *C. rosea* nestas condições contrasta com os resultados obtidos por Köhl et al. (1995b), em que o fungo não foi capaz de se estabelecer em restos

culturais de cebola sob ciclos de umedecimento e secagem. Essa discrepância de resultados é, provavelmente, resultado da melhor adaptação de *C. rosea* às características ecológicas dos restos culturais de roseira que os de cebola. Como estas características não foram quantificadas, é razoável supor que *C. rosea* possui maior capacidade competitiva em folhas de roseira, demonstrada pela sua eficiência em colonizar e se estabelecer rapidamente nestes tecidos, mesmo sob condições adversas de ambiente. Estes resultados reforçam a necessidade de se conhecerem os atributos ecológicos do agente de controle biológico, para que se previnam fracassos e decepções no seu uso (Sutton et al., 1997; Köhl et al., 1999).

Pouco se conhece sobre a dinâmica de colonização e esporulação de *C. rosea* em restos de cultura. Para *B. cinerea*, as informações são bastante diversas e, em alguns casos, conflitantes. Entretanto, de modo geral, o patógeno é favorecido por temperaturas amenas (18 a 22°C), alta umidade relativa do ar (>85%) e presença de água livre na superfície dos tecidos (Jarvis, 1992). Neste estudo, a intensidade de colonização dos restos culturais por *B. cinerea* (na testemunha) e *C. rosea* (no tratamento com *C. rosea* apenas), avaliada indiretamente pela esporulação dos fungos em PCA, foi satisfatoriamente explicada pelas variáveis UR<sub>máx</sub>, UR<sub>mín</sub>, T<sub>máx</sub> e PPT. A umidade relativa máxima (UR<sub>máx</sub>) foi o principal fator de estímulo à colonização de ambos os fungos, provavelmente por sua influência direta no teor de umidade dos restos culturais. Este resultado está de acordo com os relatados por Köhl et al. (1995) e Köhl et al. (1998), nos quais o teor de umidade nos restos culturais de cebola e de ciclâmen foram fatores determinantes na colonização e esporulação de *B. cinerea* e *C. rosea*. A umidade relativa mínima (UR<sub>mín</sub>) e a temperatura máxima (T<sub>máx</sub>) exerceram efeitos diretos negativos sobre a colonização dos restos por *B. cinerea* e *C. rosea*, provavelmente por estarem associadas ao dessecamento dos restos. A precipitação pluviométrica (PPT) exerceu apenas efeito indireto, principalmente sobre a umidade relativa do ar.

Pela análise do efeito das variáveis climáticas sobre a colonização de restos culturais de roseira por *B. cinerea* e *C. rosea*, os requerimentos ambientais para os dois fungos são parecidos, fato bastante relevante em termos do estabelecimento de uma estratégia para o controle biológico do patógeno. Neste contexto, *C. rosea* pode ser empregado efetivamente, objetivando reduzir a esporulação de *B. cinerea*, mesmo em condições favoráveis ao patógeno, o que o difere de outros agentes de controle

biológico, como por exemplo, *Trichoderma harzianum* que possui exigências ecológicas diferentes das de *B. cinerea*, e tem sua eficiência reduzida sob condições muito favoráveis ao patógeno (Shtienberg e Elad, 1997).

*Clonostachys rosea* reduz a esporulação de *B. cinerea*, a qual, de modo geral, não é influenciada pelos fungicidas disponíveis, que interferem principalmente no processo de infecção e não são efetivos contra o patógeno nos restos culturais (Köhl e Fokkema, 1998). Assim, considera-se que o controle biológico torne-se um importante componente no manejo integrado da doença. Nesse contexto, a versatilidade de *C. rosea* pode contribuir efetivamente para o controle da produção de inóculo de *B. cinerea* no sistema de produção de rosas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araújo, A. E. (1995) Sobrevivência de *Botrytis cinerea* em restos de cultura, efeito de fatores de ambiente sobre o patógeno e progresso do mofo cinzento em roseiras cultivadas em casa de vegetação. Viçosa, MG: UFV, 98p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa.
- Braun, P. G. and Sutton, J. C. (1987) Inoculum sources of *Botrytis cinerea* in fruit rot of strawberry in Ontario. Can. J. Plant Pathol. 9:1-5.
- Dubos, B. (1992) Biological control of *Botrytis*: state-of-the-art. In: Verhoeff, K., Malathrakis, N. E., Williamson, E. B. (eds). Recent advances in *Botrytis* research. Wageningen: PUDOC, p. 169-179.
- Gullino, M. L. (1992) Chemical control of *Botrytis* spp. In: Verhoeff, K., Malathrakis, N. E., Williamson, E. B. (eds). Recent advances in *Botrytis* research. Wageningen: PUDOC, p. 217-222.
- Hausbeck, M.K. and Moorman, G.W. (1996) Managing *Botrytis* in greenhouse-grown flower crops. Plant Dis. 80:1212-1219.
- Jarvis, W.R. (1992) Managing Diseases in Greenhouse Crops. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN
- Köhl J. and Fokkema N.J. (1998) Strategies for biological control of necrotrophic fungal pathogens. In: Boland GJ and Kuykendall LD (eds). Plant-Microbe Interactions and Biological Control M. Dekker Inc. New York, p. 49-88.

- Köhl, J.; Molhoek, W. M. L.; Van Der Plas, C. H. and Fokkema, N. J. (1995a) Suppression of sporulation of *Botrytis* spp. as a valid biocontrol strategy. *Eur. J. Plant Pathol.* 101:251-259.
- Köhl, J.; Van Der Plas C. H.; Molhoek, W. M. L. and Fokkema, N. J. (1995b) Effect of interrupted leaf wetness periods on suppression of sporulation of *Botrytis allii* and *B. cinerea* by antagonists on dead onion leaves. *Eur. J. Plant Pathol.* 101:627-637.
- Köhl, J.; Lombaers-Van Der Plas, C.H.; Molhoek, W.M.L.; Kessel, G.J.T. and Goossen-Van Der Geijn, H.M. (1999) Competitive ability of the antagonists *Ulocladium atrum* and *Gliocladium roseum* at temperatures favorable for *Botrytis* spp. development. *BioControl* 44:329-346.
- Monteiro, A. J. A. (1996) Avaliação da remoção de restos culturais e de fungicidas na intensidade do mofo cinzento em roseiras cultivadas em casas de vegetação. Viçosa, MG: UFV, 49p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa.
- Morandi, M.A.B. (1997) *Gliocladium roseum* como agente de biocontrole de *Botrytis cinerea* em roseiras cultivadas em casa de vegetação. Viçosa, MG: UFV, 60p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa.
- Morandi, M.A.B.; Maffia, L.A and Sutton, J.C. (2001) Development of *Clonostachys rosea* and interactions with *Botrytis cinerea* in rose leaves and residues. *Phytoparasitica* 29 (2) (in press).
- Morandi, M.A.B.; Sutton, J.C. and Maffia, L.A. (2000) Effects of host and microbial factors on development of *Clonostachys rosea* and control of *Botrytis cinerea* in rose. *Eur. J. Plant Pathol.* 106:439-448.
- Morandi, M.A.B., Sutton, J.C., Maffia, L.A. (2000). Relationships of aphid and mite infestations to control of *Botrytis cinerea* by *Clonostachys rosea* in rose (*Rosa hybrida*) leaves. *Phytoparasitica* 28:55-64.
- Peng G. and Sutton J.C. (1991) Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. *Can J Plant Pathol.* 13:247-257.
- Peng, G. and Sutton, J. C. (1990) Biological methods to control grey mould of strawberry. In: Proc. Brighton Crop Port. Conf. Pests Dis., v.3, Br. Crop Prot. Council, Farnham, England, p. 233-240.
- Schroers H.J.; Samuels G.J.; Seifert K.A. and Gams W. (1999) Classification of the mycoparasite *Clonostachys rosea* 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.

- Singh, R.K. and Chaudary, B.D. (1979) Biometrical methods in quantitative genetic analysis. Kalyani Publishers.
- Snedecor, G.W. and Cochran, W.G. (1989) Statistical methods. 8<sup>th</sup> ed. The Iowa State University Press. Ames. 503 pp.
- Snyder, R.S. and Shaw, R.H. (1984) Converting humidity expressions with computers and calculators. Univ. Calif. Coop. Ext. Leaflet. 21372.
- Sutton, J.C.; Li, D.-W.; Peng, G.; Yu, H.; Zhang, P. and Valdebenito-Sanhueza, R.M. (1997) *Gliocladium roseum*, a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. Plant Dis. 81:316-328.
- Sutton, J.C.; James, T.D.W. and Rowell, P.M. (1983) Relation of weather variables and host factor to an epidemic of botrytis leaf blight in onions. Can. J. Plant Pathol. 5:256-265.
- Sutton, J.C.; Swanton, C.J. and Gillespie, T.J. (1978) Relation of weather variables and host factors to incidence of airborne spores of *Botrytis squamosa*. Can. J. Bot. 56:2460-2496.
- Tatagiba, J.S.; Maffia, L.A.; Barreto, R.W.; Alfenas, A.C. and Sutton, J.C. (1998) Biological control of *Botrytis cinerea* in residues and flowers of rose (*Rosa hybrida*). Phytoparasitica. 26:8-19.
- Yu, H. and Sutton, J.C. (1997) Morphological development and interactions of *Gliocladium roseum* and *Botrytis cinerea* in raspberry. Can. J. Plant Pathol. 19:237-246.

## CONCLUSÕES GERAIS

*Botrytis cinerea* é responsável por severos danos a uma ampla gama de plantas cultivadas de importância econômica, principalmente em cultivos protegidos. Nos últimos anos, com o aumento do cultivo protegido no Brasil, o mofo cinzento tem se tornado sério problema fitossanitário para diversas culturas, como roseira, morangueiro, tomateiro, crisântemo, viveiros de eucalipto e outras.

O controle do patógeno é difícil em face da possibilidade de diferentes formas de sobrevivência e infecção em seu ciclo de vida, associado a uma grande variabilidade genética. Assim, a integração de tratamentos químicos com sistemas de manejo cultural e agentes de biocontrole é a estratégia mais realista e racional para o manejo do mofo cinzento. Portanto, é necessário adotar o manejo integrado e, neste contexto, é fundamental lançar mão do controle biológico, por ser esta alternativa satisfatória do ponto de vista ambiental para suplementar o controle químico.

Com base no conjunto de conhecimentos adquiridos anteriormente sobre a ecologia de *Clonostachys rosea* e seus mecanismos de interação e biocontrole de *B. cinerea*, procurou-se, neste trabalho, responder as seguintes questões:

5. *C. rosea* é capaz de se estabelecer endofiticamente nos tecidos de roseira e, com isso ser mais competitivo com o crescimento saprofítico do patógeno quando da senescência dos tecidos?
6. *C. rosea* é capaz de competir eficientemente com os microrganismos indígenas e de se estabelecer nos restos culturais de roseira em condições naturais?
7. *C. rosea* é capaz de colonizar ferimentos provocados por pragas, podas, colheitas ou outros tratamentos culturais de forma a limitar estas portas de entrada do patógeno?
8. *C. rosea* é eficiente na redução da esporulação de *B. cinerea* sob condições de cultivo comercial de rosas sob casa de vegetação?

*Clonostachys rosea* germinou, estabeleceu endofiticamente e esporulou abundantemente quando aplicado em tecidos maduros, senescentes ou mortos. A presença de ferimentos nos tecidos maduros dobrou a germinação dos esporos, acelerou a colonização dos tecidos e a esporulação do fungo. Em folhas maduras em que se aplicou *C. rosea* imediatamente depois de feridas ou até 24 h após o ferimento e,

subseqüentemente inoculadas com *B. cinerea*, a germinação e a esporulação do patógeno foram significativamente reduzidas.

**Conclusão 1:** *C. rosea* estabeleceu-se eficientemente e suprimiu, marcadamente, a esporulação de *B. cinerea* em folhas e pétalas de roseira, independentemente do estágio de desenvolvimento dos tecidos e da presença de ferimentos.

A ocorrência de um período de 24h de alta umidade antes das aplicações em folhas senescentes e mortas estimulou o crescimento dos fungos indígenas presentes e reduziu a esporulação de *C. rosea* e *B. cinerea*. Em folhas mortas, a presença destes fungos contribuiu para o controle do patógeno, quando associado a *C. rosea*. Isolados indígenas de *Penicillium* sp. e *Alternaria alternata*, quando aplicados em alta densidade de inóculo, interagiram com *C. rosea*, mas não reduziram significativamente o controle do patógeno.

**Conclusão 2:** *C. rosea* foi capaz de competir eficientemente com a microbiota natural e se estabelecer na comunidade microbiana dos restos culturais de roseira. Densidades naturais de fungos da microbiota das folhas de roseira não interferiram significativamente na eficiência do agente em controlar o patógeno.

Infestações de pulgões (*Macrosiphum rosae* L.) e de ácaros (*Tetranychus urticae* Koch) influenciaram positivamente a germinação, colonização e esporulação de *Clonostachys rosea* e *Botrytis cinerea* em folhas de roseira. A germinação e o crescimento do tubo germinativo de *C. rosea* e *B. cinerea* no filoplano foram muito maiores nas folhas previamente infestadas por pulgões e ácaros do que naquelas não infestadas. Na aplicação combinada, *C. rosea* suprimiu significativamente a germinação de *B. cinerea* em folhas não infestadas, porém, nas folhas infestadas, o agente foi ineficiente e a germinação do patógeno foi elevada. A infestação com pulgões e ácaros aumentou marcadamente a esporulação de *C. rosea* e *B. cinerea* quando aplicados isoladamente. Entretanto, nas folhas em que se aplicou *C. rosea* mais *B. cinerea*, o agente suprimiu quase completamente a esporulação do patógeno, tanto nas folhas infestadas quanto nas não infestadas. O aumento na disponibilidade de nutrientes no filoplano, através da exsudação de seiva das folhas ou da excreção de dejetos açucarados pelos

pulgões é proposto como a base para se explicar os efeitos das infestações destas pragas sobre *C. rosea* e *B. cinerea*.

**Conclusão 3:** Infestações com ácaros e afídeos, apesar de favorecerem a germinação, colonização e esporulação do patógeno, não comprometeram a habilidade de *C. rosea* em suprimir a produção de inóculo de *B. cinerea* em folhas de rosa infestadas.

*Clonostachys rosea* estabeleceu eficientemente nos restos culturais de roseira em cultivo comercial sob casa de vegetação, verificado pelo incremento na incidência de esporulação do fungo nos restos a cada avaliação quinzenal, pelo alto valor da área abaixo da curva de esporulação de *C. rosea* ao final do experimento e pela redução crescente na esporulação de *B. cinerea* nos tratamentos onde o agente foi aplicado. Na aplicação do fungicida mancozeb em combinação com *C. rosea* ocorreu pequena redução na esporulação do agente ao longo do experimento, entretanto, não comprometeu significativamente o controle da esporulação de *B. cinerea*. A redução na esporulação do patógeno, entretanto, não resultou em redução significativa na incidência da doença, em vista de três prováveis fatores: i- o tratamento com *C. rosea* iniciou-se no final de janeiro, quando a epidemia do mofo cinzento já estava em estágio avançado; ii- não foram realizadas práticas de saneamento ao longo do experimento; e iii- a casa de vegetação não foi tratada com *C. rosea* em sua totalidade, o que permitiu a multiplicação do patógeno nas plantas bordaduras. Pela análise do efeito das variáveis climáticas sobre a colonização de restos culturais de roseira por *B. cinerea* e *C. rosea*, considera-se que os requerimentos ambientais para os dois fungos são parecidos, fato relevante em termos do estabelecimento de uma estratégia para o controle biológico do patógeno.

**Conclusão 4:** Mesmo em condições extremamente favoráveis ao patógeno, *C. rosea* foi eficiente em reduzir a esporulação de *B. cinerea* nos restos culturais de roseira.

O efeito de *C. rosea* no controle da esporulação de *B. cinerea* não é, de modo geral, exercido pelos fungicidas disponíveis, os quais interferem principalmente no processo de infecção, mas não são efetivos contra o patógeno nos restos culturais, o que torna o controle biológico um importante componente no manejo integrado da doença. *Clonostachys rosea* tem flexibilidade na associação com folhas e pétalas de rosa e no controle da esporulação de *B. cinerea* em resíduos de folhas e pétalas. O antagonista estabeleceu-se no hospedeiro e efetivamente suprimiu o patógeno, independentemente do estágio de desenvolvimento dos tecidos e da presença de ferimentos, o que pode ser relevante no cultivo de rosas onde é freqüente a existência de ferimentos causados por tratos culturais ou insetos e ácaros. Espera-se que o uso continuado de *C. rosea*, ao longo de vários ciclos produtivos de rosa, possa reduzir a população de *B. cinerea* no interior das casas de vegetação a níveis suficientemente baixos para proporcionar significativa redução na incidência do mofo cinzento em botões. Portanto, a versatilidade de *C. rosea* pode contribuir efetivamente para o controle da produção de inóculo de *B. cinerea* no sistema de produção de rosas.