

WILLIAM DIAS TEIXEIRA

**SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Clonostachys* spp. PARA O CONTROLE DA  
PINTA PRETA DA BATATEIRA**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

T266s  
2018  
Teixeira, William Dias, 1990-  
Seleção de isolados de *Clonostachys* spp. para o controle da  
pinta preta na batateira / William Dias Teixeira. – Viçosa, MG,  
2018.  
viii, 39f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Lucas Magalhães de Abreu.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 27-37.

1. Batata - Doenças e pragas. 2. *Clonostachys*. 3.  
*Alternaria solani*. 4. Pinta-preta. I. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Programa de  
Pós-Graduação em Fitopatologia. II. Título.


CDD 22. ed. 633.59464

WILLIAM DIAS TEIXEIRA


**SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Clonostachys* spp. PARA O CONTROLE DA  
PINTA PRETA NA BATATEIRA**


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

APROVADA: 27 de julho de 2018.

  
Gleiber Quintão Furtado

  
Eduardo Seiti Gomide Mizubuti

  
Carine Rezendes Cardoso

  
Lucas Magalhães de Abreu  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

Em memória ao meu pai Marcos Laureano Teixeira pela fonte de inspiração;  
A minha mãe Gilda Helena Sena Dias Teixeira pelo carinho, incentivo e apoio incondicional;

Ao meu irmão Marcelo Dias Teixeira pela amizade e incentivo;

A Universidade Federal de Viçosa pela a oportunidade oferecida de cursar o mestrado;

Ao professor Lucas Magalhães de Abreu, pela orientação, paciência e amizade;

Aos integrantes do Laboratório de Biologia de Populações de Fitopatógenos (BIOPOP) pelo auxílio e por ceder equipamentos necessários para execução dos experimentos realizados;

Aos demais professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos;

A todos integrantes do Laboratório de Controle Biológico da Universidade Federal de Viçosa, pela amizade e apoio nestes dois anos. Este é um trabalho de um grupo inteiro que contribuiu de todas as formas para a realização desta dissertação;

Ao funcionário Mário, pela amizade e apoio fornecido durante os experimentos;

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia pela ajuda fornecida;

Aos companheiros da República Náufragos, pela amizade e fraternidade;

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo incentivo financeiro para execução dos experimentos.

## **BIOGRAFIA**

William Dias Teixeira, filho de Marcos Laureano Teixeira e Gilda Helena Sena Dias Teixeira, nasceu em Lavras, Minas Gerais, 8 de julho de 1990.

Em 2010, ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal de Lavras, graduando-se em março de 2016.

Em agosto de 2016 iniciou o mestrado em Fitopatologia na Universidade federal de Viçosa.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	v
LISTA DE TABELAS .....	vi
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	2
2.1 Cultura da batata: importância e características do cultivo no Brasil .....	2
2.2 Pinta preta da batateira: etiologia, epidemiologia e controle da doença .....	4
2.3 <i>Clonostachys</i> spp.: diversidade, biologia e usos no controle biológico .....	8
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	10
3.1. Obtenção e preservação dos isolados de <i>Alternaria grandis</i> e <i>Clonostachys</i> spp.....	10
3.2. Condução das plantas de batata em vasos .....	12
3.3. Teste de patogenicidade em plantas de batata para seleção dos isolados de <i>Alternaria grandis</i> .....	12
3.4. Seleção dos isolados de <i>Clonostachys</i> para o controle da pinta preta na parte aérea de plantas de batata cultivadas em casa de vegetação.....	13
3.5. Controle biológico da pinta preta da batateira com isolados de <i>Clonostachys</i> spp. selecionados na triagem .....	14
3.6. Avaliação da inibição de germinação de conídios de <i>Alternaria grandis</i> na presença de <i>Clonostachys</i> spp.....	15
3.7. Análise estatística dos resultados dos experimentos .....	15
4. RESULTADOS.....	16
4.1 Seleção dos isolados de <i>Clonostachys</i> para o controle da pinta preta em plantas de batata cultivadas em casa de vegetação .....	16
4.2 Controle da pinta preta na batateira com isolados <i>Clonostachys</i> spp. selecionados na triagem .....	18
4.3 Avaliação da inibição de germinação de conídios de <i>Alternaria grandis</i> por suspensões e filtrados do cultivo de <i>Clonostachys</i> spp.....	21
5. DISCUSSÃO.....	22
6. CONCLUSÕES.....	26
7. REFERÊNCIAS .....	27
8. DADOS SUPLEMENTARES .....	38

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Teste de comparação das medianas para severidade da pinta-preta da batata aos 5 dias após a inoculação. Os valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente ( $P>0,05$ ). .....	16
Figura 2. Porcentagem de desfolha de plantas de batata tratadas com <i>Clonostachys</i> spp. e inoculadas com <i>Alternaria grandis</i> aos 5, 8 e 11 dias após a inoculação. ....	17
Figura 3. Correlação de Spearman entre os valores de área abaixo da curva de desfolha e os valores de severidade causados pela pinta preta da batateira aos 5 dias após a inoculação. ....	18
Figura 4. Progresso da severidade da pinta preta em plantas de batata tratadas com <i>Clonostachys</i> spp. ao longo de 8 dias após a inoculação de <i>Alternaria grandis</i> . ....	19
Figura 5. Valores médios de intervalo de confiança da área abaixo da curva de progresso da pinta preta em plantas de batata tratadas com diferentes espécies de <i>Clonostachys</i> spp. e inoculadas com <i>A. grandis</i> . ....	20
Figura 6. Porcentagem de germinação de conídios de <i>Alternaria grandis</i> incubados com suspensões de conídios ou filtrados (F) de cinco isolados de <i>Clonostachys</i> em três concentrações (suspensão bruta a 20 g/L, $10^6$ e $10^3$ conídios/mL). ....	21
Figura 7. Concentrações de conídios de <i>Clonostachys</i> spp. nas suspensões preparadas com arroz colonizado triturado em água em na concentração de 20 g/L nas três aplicações realizadas durante a triagem. ....	38
Figura 8. Porcentagem de severidade da pinta preta da batateira aos 5, 8 e 11 dias após a inoculação durante triagem com isolados de <i>Clonostachys</i> spp. ....	39

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isolados de <i>Alternaria grandis</i> .....	11
Tabela 2. Isolados de <i>Clonostachys</i> spp.....	11
Tabela 4. Teste de Kruskal-Wallis e agrupamento de médias e medianas da severidade da pinta preta na batateira aos 8 dias após a inoculação. ....	20

## RESUMO

TEIXEIRA, William Dias, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018. **Seleção de isolados de *Clonostachys* spp. para o controle da pinta preta da batateira.** Orientador: Lucas Magalhães de Abreu.

A pinta preta, causada por *Alternaria solani lato sensu*, é uma das principais doenças da batateira no mundo. O manejo é comumente feito com a utilização de fungicidas, cujo uso excessivo pode resultar em danos ambientais e perda da eficiência ao longo do tempo. *Clonostachys rosea* é um agente de controle biológico usado no manejo de doenças causadas por fungos. Mais de 40 espécies de *Clonostachys* já foram descritas, e várias dessas são micoparasitas e potencialmente úteis para o biocontrole de doenças de plantas. Este trabalho teve como objetivo selecionar isolados pertencentes a cinco espécies do gênero *Clonostachys* spp. capazes de controlar a pinta preta da batateira. Uma triagem foi realizada com plantas cultivadas em casa de vegetação, utilizando vinte isolados de *Clonostachys* spp. cultivados em arroz. A partir de 24 dias após o plantio (DAP), três aplicações de *Clonostachys* spp. foram feitas a cada sete dias, seguidas da inoculação 48h após a última aplicação. Com base nos valores de redução da doença avaliados aos cinco dias após a inoculação e porcentagem desfolha observada ao longo de 11 dias, foram selecionados cinco isolados promissores: UCBV 5 (*C. pseudochloroleuca*), UCBV 7 (*C. chloroleuca*), UCBV 38 (*C. rhizophaga*), UCBV 101 (*C. rogersoniana*) e UCBV 133 (*C. rosea*). Estes foram empregados em um segundo ensaio para validação da eficiência de biocontrole. Os tratamentos com os isolados UCBV 7 e UCBV 133 apresentaram maior nível de controle, acima de 80%, ao final de três avaliações. Os tratamentos com os isolados UCBV 5 e UCBV 38 apresentaram níveis intermediários de controle, em torno de 65%, e aquele com o isolado UCBV101 não foi satisfatório. Um ensaio *in vitro* mostrou que 86 a 100 % dos conídios de *A. grandis* não germinaram após 24 h de incubação com suspensões concentradas de conídios dos cinco isolados selecionados na triagem. Estes resultados demonstram que diferentes espécies de *Clonostachys* são capazes antagonizar *A. grandis* e reduzir a intensidade da pinta preta da batateira quando usados em aplicações foliares preventivas. Os isolados mais eficientes selecionados serão usados futuramente para testes com formulações e experimentos de biocontrole no campo.

## ABSTRACT

TEIXEIRA, William Dias, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2018. **Selection of *Clonostachys* spp. isolates for control of early blight of potato.** Advisor: Lucas Magalhães de Abreu.

Early blight, caused by *Alternaria solani lato sensu*, is one of the most important diseases of potato worldwide. Its management is usually accomplished with fungicides, which in excess use can result in environmental damage and loss of efficiency over time. *Clonostachys rosea* is a biocontrol agent with potential use in the control of diseases caused by fungi. More than 40 species of *Clonostachys* have been already described, and many have demonstrated a mycoparasitic behavior and potential use for biocontrol of plant diseases. The objective of this study was to select *Clonostachys* spp. for the control of early blight of potato. Twenty isolates of *Clonostachys* spp. were used for screening on plants cultivated under greenhouse environment. After 24 days after planting (DAP), three applications of *Clonostachys* spp. were performed at every seven days, followed by the pathogen inoculation 48 hours after the last application. Based on the disease severity evaluated five days after inoculation and the defoliation percentage observed over 11 days, five isolates were selected: UCBV 5 (*C. pseudochloroleuca*), UCBV 7 (*C. chloroleuca*), UCBV 38 (*C. rhizophaga*), UCBV 101 (*C. rogersoniana*) and UCBV 133 (*C. rosea*). These selected isolates were used for tests of biocontrol efficiency. The isolates UCBV 7 and UCBV 133 provided higher levels of disease control, above 80%, at the end of three evaluations. The isolates UCBV 5 and UCBV 38 provided intermediate levels of control, approximately 65%, and the isolate UCBV101 did not present satisfactory results. An *in vitro* assay showed that 86 to 100% conidia of *Alternaria grandis* did not germinate after 24 h of incubation in suspensions of the 5 selected isolates. Different species of *Clonostachys* spp. have antagonistic potential against *A. grandis* and can reduce the severity of early blight of potato when used in preventive foliar applications. The most efficient isolates will be used for future tests on field experiments and formulations.

## 1. INTRODUÇÃO

A batata está entre os alimentos mais consumidos no mundo e sua produção é destaque no estado de Minas Gerais, maior produtor brasileiro (IBGE, 2018). Doenças foliares são comuns nos plantios de batata e requerem manejo correto para evitar o progresso de epidemias e perdas drásticas na produção. A requeima, causada por *Phytophthora infestans*, é responsável por perdas nas safras de inverno. Já a pinta preta, causada por *Alternaria solani lato sensu*, predomina nos cultivos de verão, responsáveis pela maior parte da produção de batata no Brasil, o que torna esta doença um problema constante para os produtores do país (Töfoli et al., 2013; Miranda e Silva, 2017).

Os sintomas da pinta preta progridem das folhas mais velhas do baixeiro para as do terço médio e superior das plantas, podendo levar à completa desfolha sob condições favoráveis (Souza Dias e Iamauti, 1997). As epidemias dependem, principalmente, da frequência do molhamento foliar, do estado nutricional das plantas e da suscetibilidade da cultivar (Wharton e Wood, 2013). A utilização de fungicidas é a estratégia mais usada para o controle da pinta preta da batata, devido à facilidade de aplicação e resultados imediatos (Miranda e Silva, 2017). Entretanto, além da preocupação corrente com os impactos do uso excessivo de defensivos químicos na agricultura, o uso contínuo de poucas moléculas fungicidas resulta na seleção de genótipos resistentes em populações de fungos fitopatogênicos, fato já observado em populações do patógeno da pinta preta (Odilbekov et al., 2016; Landschoot et al., 2017).

A proteção das folhas de batateira contra a infecção e a redução da expansão das lesões de pinta preta também podem ser obtidas com o uso de agentes de controle biológico, como bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus*. Tais bactérias são produtoras de lipopeptídeos, que são ativos em membranas biológicas e capazes de danificar as células do patógeno, ou de agir indiretamente, induzindo a respostas de defesa pela planta hospedeira (e.g. Lanna Filho et al., 2010; Khan et al., 2012; Chowdappa et al., 2013). Outra estratégia de controle ainda pouco investigada é a da aplicação foliar de suspensões de fungos micoparasitas para a diminuição da intensidade da pinta preta, a exemplo do controle biológico do mofo cinzento em diferentes culturas, realizado comercialmente com a aplicação foliar de fungos dos gêneros *Trichoderma* e *Clonostachys* (e.g. Elad, 2000; Kapongo et al., 2008).

O gênero *Clonostachys* possui distribuição cosmopolita, com espécies comumente encontradas no solo, em associação com plantas vivas - como endófitos, ou

em material vegetal em decomposição (Domsch et al., 2007; Abreu et al., 2014). Isolados da espécie *Clonostachys rosea* são conhecidos por parasitar outros fungos e atuar como agentes de controle biológico de doenças radiculares e de parte aérea, causadas por diversos fitopatógenos (e.g. Sutton et al., 1997; Chatterton et al., 2008; Xue et al., 2009; Jensen et al., 2016). *C. rosea* e pelo menos cinco espécies filogeneticamente próximas ocorrem comumente no Brasil, e dados preliminares indicam que estas são capazes de parasitar outros fungos, como *Botrytis cinerea*, *in vitro* (Moreira, 2012). O presente trabalho foi embasado na hipótese de que isolados de outras espécies de *Clonostachys* sejam tão ou mais eficientes do que aqueles de *C. rosea* no controle biológico de doenças.

O objetivo deste estudo foi realizar uma triagem de isolados de *Clonostachys* spp. para o biocontrole da pinta preta da batateira, por meio de ensaios em casa de vegetação com plantas inoculadas artificialmente, visando à seleção de isolados promissores para ensaios futuros envolvendo formulações e ensaios de biocontrole em campo.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Cultura da batata: importância e características do cultivo no Brasil**

A batata (*Solanum tuberosum*) é considerada o quinto produto alimentício mais produzido no mundo, ficando atrás do trigo, arroz, milho e cana-de-açúcar (FAO, 2015). O seu cultivo está presente em quase todos os estados brasileiros, sendo os principais produtores os estados de Minas Gerais, São Paulo e Paraná. Em 2017, a área plantada no Brasil foi de mais de 140 mil ha, com uma produção apurada em aproximadamente 4,3 milhões de toneladas, sendo cerca de 1,3 milhões de toneladas produzidas em MG e quase 1 milhão de toneladas em SP e PR (IBGE, 2018).

Em Minas Gerais, a produção de batata se concentra nas regiões Sul e, mais recentemente, em Alto Paranaíba, onde estão localizadas as principais indústrias processadoras e produtores que adotam maior nível tecnológico. O estado é autossuficiente em batata *in natura* e abastece outros estados, como São Paulo. Por outro lado, Minas Gerais ainda importa o produto processado de outros estados para suprir o aumento da demanda de matéria-prima para a indústria (Ribeiro, 2011; Dassié, 2017; SENAR, 2018).

A diversidade climática no Brasil permite que a batata seja cultivada em todos os meses do ano (Carmo, 2009), ocorrendo sucessivas colheitas em safras distintas. A “safra das águas” responde por mais de 50% da produção nacional, com plantio de agosto a outubro e colheita de dezembro a março, e é a época com maior incidência de doenças. A “safra da seca” é responsável por 30 % da produção nacional, com plantios de janeiro até o fim de março e colheita de abril a julho, caracterizada pela irrigação suplementar. Ainda há a “safra de inverno”, que contribui com 18% da produção do país, cujo plantio tem início de maio a julho e a colheita é realizada entre agosto e novembro (Mógor, 2017).

A batata é uma planta anual com exigências nutricionais e fisiológicas diferentes ao longo das fases de desenvolvimento. Possui quatro estádios fenológicos, sendo o estágio III (fase de início da tuberização), que ocorre por volta da quinta à sétima semana após o plantio, a fase de maior suscetibilidade a doenças. Dependendo da cultivar, o ciclo da cultura pode ser precoce ou longo, sendo de aproximadamente 100 e 120 dias do plantio à senescência das ramas, respectivamente (Ribeiro et al., 2017). Existem várias cultivares plantadas no Brasil, sendo a ‘Ágata’ a mais utilizada, ocupando mais de 50% da área cultivada (Silva et al., 2014; Ribeiro et al., 2017). Esta cultivar possui características de precocidade, produtividade elevada e boa aparência, porém, é altamente suscetível à maioria das doenças foliares, como a requeima e a pinta preta (Peeten et al., 2011).

Mais de duas dezenas de doenças causadas por vírus, bactérias, nematoides, oomicetos e fungos podem afetar os cultivos de batata (de Souza Dias et al., 1997; EMBRAPA, 2015). O enrolamento das folhas, causado por *Potato leafroll virus* (PLRV), é classificado como a principal virose que afeta a cultura no Brasil. A murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum*, ocorre em quase todas as áreas cultivadas do país, sendo a bactéria favorecida por umidade e temperatura elevadas, predominando nas safras de verão. Também ocorrem nematóides dos gêneros *Meloidogyne* e *Pratylenchus*, os quais afetam diretamente raízes e tubérculos, com prejuízos no desenvolvimento da planta e no aspecto do produto final. A requeima, causada pelo oomiceto *Phytophthora infestans*, é historicamente importante e ainda classificada como a principal doença da cultura no mundo. O patógeno é altamente virulento em condições de elevada umidade (>90 %) e temperaturas amenas (12 a 18 °C), com predomínio nas safras de inverno. Já na safra de verão, responsável pela maior

parte da produção de batata no país, uma das principais doenças é a pinta preta, causada pelo fungo *Alternaria solani lato sensu*, que afeta a parte aérea das plantas, podendo resultar em intensa desfolha a partir do período de florescimento (EMBRAPA, 2015).

## **2.2 Pinta preta da batateira: etiologia, epidemiologia e controle da doença**

O agente causal da pinta preta, importante doença encontrada nos cultivos de solanáceas, é tradicionalmente considerado como sendo o fungo *Alternaria solani* Sorauer (Rotem, 1994; Gannibal et al. 2014). Entretanto, *Alternaria solani*, como tradicionalmente delimitada com base em morfologia e especificidade de associação com hospedeiras solanáceas, em especial tomate e batata, corresponde a distintas espécies, delimitadas com base em estudos de biologia de populações e de filogenia molecular multilocus (Lourenço Jr. et al. 2009, Rodrigues et al. 2010, Woudenberg et al. 2014). Em levantamentos realizados no Brasil, foi constatado que as populações de *Alternaria* associadas à pinta preta em tomateiro pertencem, majoritariamente, à espécie *Alternaria linariae* (= *Alternaria tomatophila*). Já em plantios de batata, a espécie predominante é *Alternaria grandis*, táxon filogeneticamente muito próximo a *Alternaria solani stricto sensu* (Rodrigues et al. 2010; Woudenberg et al. 2014). Em ensaios de inoculação cruzada com isolados destas populações brasileiras, a despeito da recorrência destas duas espécies em hospedeiros distintos, ambas (*A. grandis* e *A. linariae*) foram capazes de induzir sintomas de pinta preta tanto em tomate quanto em batata (Rodrigues et al. 2010). Neste contexto, o termo *Alternaria solani lato sensu* pode ser usado em referência a essas populações de *A. grandis*, *A. solani stricto sensu* e outras espécies próximas capazes de infectar plantas de batata no campo.

A *Alternaria* é um gênero pertencente à Ordem Pleosporales e Família Pleosporaceae do Filo Ascomycota. O gênero contém mais de vinte sessões, correspondentes grupos monofiléticos bem definidos, sendo *Alternaria solani l.s.* membro da Seção *Porri* (Woudenberg et al. 2013). A maior parte das espécies de *Alternaria* se reproduz apenas assexuadamente, sendo os conídios, produzidos em conidióforos melanizados, emblemáticos do gênero. Estes podem ser formados em cadeias (e.g. espécies da Seção *Alternata*) ou solitários, como no caso das espécies da Seção *Porri* (Woudenberg et al. 2013). São conídios tipicamente obclavados ou ovóides, frequentemente apresentando bicos, são multicelulares com septos transversais e oblíquos ou longitudinais e possuem coloração marrom clara a marrom (Rotem,

1994). Os conidióforos são castanhos escuros, de paredes espessas, retos a flexuosos, septados e podem surgir isolados ou em pequenos grupos. Dentro de *A. solani* l.s., *A. grandis* pode ser diferenciada de outras espécies pela produção de conídios com até o dobro do comprimento daqueles produzidos por *A. linariae* e *A. solani* s.s. (Rodrigues et al. 2010).

*Alternaria solani* l.s. é um patógeno necrotrófico capaz de realizar muitos ciclos de infecção ao longo da estação de cultivo. Durante a entressafra, o patógeno pode sobreviver como micélio ou conídios no solo, em tubérculos infectados, em plantas hospedeiras alternativas e, frequentemente, nos restos culturais. Este patógeno sobrevive bem em solos secos e áreas de pousio, favorecido pela pigmentação escura das suas hifas (Rotem, 1994; Van Der Waalls et al., 2001). Clamidósporos, provenientes de hifas e formados através do espessamento dos conídios, também compõem uma forma de resistência em solos contendo resíduos de plantas infectadas por *A. solani* l.s., atuando como uma importante fonte primária de inóculo. Alguns autores relatam presença de clamidósporos viáveis de 7 até 12 meses em restos culturais (Basu, 1971; Patterson, 1991).

O tempo entre a inoculação de *A. solani* l.s. e início dos sintomas nas folhas depende das condições ambientais, suscetibilidade da cultivar, posição das folhas nas plantas e idade das plantas (Pelletier e Fry, 1989; Dita Rodriguez et al. 2006), sendo o de 24 h em condições experimentais com 100% de umidade relativa e temperatura de 25°C (Vloutoglou e Kalogerakis, 2000). A germinação dos conídios é facilitada pela alta umidade, na forma de água livre, e frequentemente ocorre quando a umidade relativa está próxima à saturação. A temperatura ótima para a germinação está em torno de 25°C. Os tubos germinativos são capazes de retomar o crescimento quando reidratados, possibilitando a infecção em regimes de curtos períodos de molhamento interrompidos por períodos de seca (Rotem, 1994).

Os sintomas iniciam-se em folhas mais velhas do baixeiro, progredindo para as folhas do terço médio e superior da planta. Os sintomas observados são pontuações concêntricas delimitadas pelas nervuras da folha. Com o passar do tempo, essas lesões tendem a aumentar e sua coloração escurece, observando-se clorose nos tecidos ao redor (Souza Dias e Iamauti, 1997). Em condições favoráveis, a doença pode levar à completa desfolha da planta. A doença pode ocorrer em um amplo espectro de condições climáticas e depende, principalmente, da frequência do molhamento foliar, do estado

nutricional da planta e da susceptibilidade da cultivar (Wharton e Wood, 2013). A dispersão dos conídios do patógeno pode ser facilitada pelo vento, batatas-semente infectadas, água da chuva e irrigação (Rotem, 1994; Miranda e Silva, 2017).

Áreas com plantios sucessivos de batata ou intercaladas com outras solanáceas, com um curto período de rotação entre culturas, favorecem o aumento do inóculo inicial nos restos culturais durante a entressafra, possibilitando aumento da intensidade da doença nas safras futuras (Manzer e Merriam, 1974; Shtienberg e Fry, 1990). As perdas na produção em decorrência da pinta preta geralmente não excedem a 20%, porém, na ausência de práticas de controle da doença, as perdas podem ser bem maiores (Wharton e Wood, 2013).

A resistência apresentada pelas cultivares de batata à pinta preta é uma característica quantitativa e está relacionada com a idade de maturação das plantas. As cultivares com alto e moderado grau de resistência possuem maturação tardia em relação às cultivares suscetíveis, que apresentam maturação antecipada. A idade das folhas também influencia na intensidade da doença, com folhas mais velhas sendo mais suscetíveis (Shtienberg e Fry, 1990; Rotem, 1994; Dita Rodriguez et al., 2006; Duarte et al., 2014). A suscetibilidade das plantas pode ser agravada por ferimentos causados por insetos e por molhamento temporário durante o dia (Rotem, 1994). Outro fator que pode afetar a suscetibilidade das cultivares é o potencial de inóculo presente nos restos culturais encontrados nas áreas de plantio; um baixo potencial de inóculo pode resultar em um atraso no aparecimento da doença em cultivares suscetíveis (Shtienberg e Fry, 1990). A utilização de cultivares resistentes no Brasil ainda não é comum, pois a maioria das cultivares plantadas são importadas e, apesar de produzirem tubérculos com características apreciadas pelo mercado consumidor, não possuem resistência às principais doenças que ocorrem no país (Duarte et al., 2014, Ribeiro et al., 2017).

Para o controle da pinta preta na cultura da batata, a prática mais empregada é a utilização de fungicidas, devido à facilidade de aplicação somada com os resultados imediatos (Miranda e Silva, 2017). Entretanto, o uso contínuo de fungicidas, além de oferecer riscos à saúde humana e ao ambiente, provoca a seleção de genótipos resistentes nas populações de fungos fitopatogênicos. A resistência de fungos a fungicidas pode afetar toda uma cadeia produtiva, englobando as indústrias agroquímicas, agricultores e consumidores (Ghini e Kimati, 2000; Ishii, 2006).

Atualmente, observa-se a dependência a poucas moléculas presentes em fungicidas sistêmicos que surtem efeito significativo no controle de doenças de plantas, sendo aquelas dos grupos triazóis, estrobilurinas e inibidores da succinato desidrogenase as mais utilizadas (Juliatti et al., 2015). Há relatos da perda de sensibilidade a diferentes fungicidas por espécies patogênicas de *Alternaria* provenientes de campos de produção com o uso intensivo de fungicidas (e.g. Avenot et al., 2008), incluindo populações de *A. solani* com baixa sensibilidade a estrobilurinas em campos de plantio de batata (Odilbekov et al., 2016; Landschoot et al., 2017).

Outras práticas são aplicáveis à bataticultura visando ao controle de doenças de parte aérea, como a pinta preta, como: adubação equilibrada, principalmente a nitrogenada; utilização de batatas-semente certificadas livres de patógenos; o plantio fora de regiões de baixada ou sujeitas a alta umidade por um longo tempo; o plantio não consecutivo com batata ou tomate, ou próximo a lavouras velhas; remoção e queima de restos culturais de plantas infectadas ou aração para enterrar os resíduos vegetais, ajudando a reduzir o inóculo nas safras futuras (Wharton e Wood, 2013; Miranda e Silva, 2017). Outra prática de manejo que pode ser aplicada no controle da pinta preta em batateira é a utilização de agentes de controle biológico (MAPA, 2018)

Embora já exista um produto comercial registrado no Brasil para o controle biológico das doenças causadas por *Alternaria solani* *l.s.* em solanáceas cultivadas, incluindo batata e tomate (i.e. Sonata - Bayer, *Bacillus pumilus* - QST 2808; MAPA, 2018), informações científicas sobre o tema são escassas. Os relatos disponíveis geralmente trazem resultados de ensaios *in vitro* visando à inibição do crescimento de *A. solani* *l.s.* e os ensaios com plantas são, em sua maioria, realizados com tomateiro. A inibição do crescimento micelial pode ser induzida por diferentes espécies de bactérias formadoras de endósporos dos gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus* (Lanna Filho et al., 2010; Khan et al., 2012; Abdalla et al., 2014; Pane e Zacardelli, 2015), havendo também, relato da inibição por *Trichoderma harzianum* (Chowdappa et al., 2013). Além do antagonismo *in vitro*, a diminuição da intensidade da pinta preta em tomateiro também foi demonstrada após a aplicação, foliar ou via solo, de *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Trichoderma* e atribuída à proteção direta das folhas de tomateiro contra a infecção por *A. solani* *l.s.* através de antibiose e/ou à indução de resistência em plantas de tomate tratadas com tais organismos (Lanna Filho et al., 2010; Fontenelle et al., 2011; Khan et al., 2012; Chowdappa et al., 2013; Pane e Zacardelli, 2015). O controle biológico da

pinta preta em batateira com um produto à base de oósporos de *Pythium oligandrum* (Polyversum WP) também resultou em reduções do índice de infecção foliar, em experimentos conduzidos por três anos (Cwalina-ambroziak et al., 2015). Embora espécies de *Alternaria* possam ser parasitadas por várias espécies de fungos e existam propostas do uso de micoparasitas no controle biológico das alternarioses (e.g. Hoch et al., 1977; Tsuneda e Skoropad, 1978; Turhan, 1993), tal estratégia aplicada às doenças causadas por *A. solani* l.s. ainda espera por iniciativas de pesquisa.

### **2.3 *Clonostachys* spp.: diversidade, biologia e usos no controle biológico**

Espécies do gênero *Clonostachys* (Ordem Hypocreales, Família Bionectriaceae, Ascomycota) são cosmopolitas, comumente encontradas no solo ou associadas ao tecido vegetal morto (Domsch et al., 2007). A maior parte das espécies descritas no gênero pertencem ao subgênero *Bionectria* e são caracterizadas pela formação de conidióforos dimórficos, verticilados e penicilados, em sua reprodução assexuada. Estas formam colônias de coloração clara, geralmente adquirindo tons de rosa, amarelo ou verde, devido à agregação de massas coloridas de conídios ou à produção de exsudados no meio de cultura. Os conídios são unicelulares, hialinos e assimétricos, com uma face reta e outra curvada, sendo aqueles produzidos nos conidióforos penicilados arranjados em cadeia (Schoers, 2001).

Mais de quarenta espécies são conhecidas no gênero *Clonostachys* e dez destas foram identificadas a partir isolamentos de diferentes substratos em vários estados do Brasil (Schroers, 2001; Abreu et al., 2014), incluindo a espécie *Clonostachys chloroleuca*, descrita recentemente a partir de isolados oriundos de amostras de solo dos estados de Goiás e Minas Gerais (Moreira et al., 2016).

A espécie *Clonostachys rosea* é amplamente conhecida e utilizada na agricultura. Micoparasitas destrutivos, isolados de *C. rosea* são capazes de parasitar outros fungos e atuar como agentes de controle biológico de doenças radiculares e de parte aérea causadas por fungos fitopatogênicos dos gêneros *Bipolaris*, *Botrytis*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Rhynchosporium*, *Sclerotinia*, dentre outros (Sutton et al., 1997; Tarantino et al., 2007; Chatterton et al., 2008; Xue et al., 2009; Koch et al., 2010; Rodríguez et al., 2011; Keyser et al., 2015; Jensen et al., 2016). Ensaios conduzidos em condições controladas e de campo mostraram a eficácia do biocontrole de fitopatógenos por *C. rosea* em condições brasileiras, em especial no controle de

*Botrytis cinerea*, causador do mofo cinzento em diversas culturas (Nobre et al. 2005; Cota et al., 2008; Cota et al., 2009; Silvera-Pérez et al., 2010; Borges et al. 2015). Em relação ao biocontrole de doenças causadas por espécies de *Alternaria*, o uso de *C. rosea* em tratamento de pré-germinação (biopriming) em lotes de semente de cenoura reduziu os níveis de tombamento de plântulas, causados por *A. dauci* e *A. radicina*, a níveis estatisticamente similares aos obtidos com o controle químico (Jensen et al., 2004).

Uma vez aplicados sobre a parte aérea das plantas, isolados de *C. rosea* são capazes de realizar colonização epifítica e endofítica (Ravnskov et al., 2006; Nordström, 2014; Høyer et al., 2016), porém a biomassa sobrevivente nos tecidos foliares cai drasticamente após alguns dias, o que leva à necessidade de reaplicações semanais para o controle efetivo de doenças no campo (Cota et al., 2008; Cota et al., 2009). Quando já senescentes, os tecidos vegetais são rapidamente colonizados por *C. rosea*, fato que se correlaciona ao número elevado de genes codificadores de enzimas envolvidas na degradação de carboidratos vegetais presentes no genoma desta espécie, comparáveis ao encontrado no genoma de espécies fitopatogênicas (Karlsson et al., 2015).

Outras características ligadas à capacidade antagonista de *Clonostachys* frente a outros fungos são a capacidade de produção de substâncias bioativas do metabolismo secundário, como peptaibóis, bissorbicilinóides e glisopreninas (Sternner et al., 1998; Rodríguez et al., 2011; Meng et al., 2016; Zhai et al., 2016) e, principalmente, a tolerância a altas concentrações de substâncias tóxicas produzidas por outros fungos, como micotoxinas e agentes oxidantes, e até fungicidas comumente usados no controle de doenças de plantas (Dubey et al. 2014, 2016; Kosawang et al., 2014; Karlsson et al., 2015). A tolerância de *C. rosea* a diferentes classes de substâncias tóxicas é devida à ação de proteínas transportadoras de membrana do tipo ABC, cujos genes estão presentes em um número superior ao da maioria das espécies de fungos com genoma sequenciado e anotado (Karlsson et al., 2015). Enzimas quitinolíticas também são empregadas por *C. rosea* durante a interação com outros fungos (Mamarabadi et al. 2008; Chatterton e Punja, 2009). Porém, o número de isoformas de quitinases produzidas por *C. rosea* é inferior ao encontrado em outras espécies de fungos da ordem Hypocreales, como *Fusarium* e *Trichoderma*, o que levou à hipótese de que a capacidade de detoxificação e tolerância a agentes oxidativos, mediada por

transportadores ABC, estejam diretamente envolvidos no micoparasitismo e efeito de biocontrole apresentado por *C. rosea* (Karlsson et al., 2017).

O micoparasitismo e capacidade de tolerar substâncias tóxicas não são características exclusivas de *C. rosea*, mas provavelmente compartilhadas com outras espécies filogeneticamente próximas (Karlsson et al., 2015), como exemplificado no caso do isolado 67-1 de *Clonostachys*, utilizado no biocontrole de mofo branco e murcha de *Fusarium* na China (Tian et al., 2014; Sun et al., 2015). Este isolado, de coloração verde e não rósea, era até pouco tempo identificado como *C. rosea*, até a sua reclassificação como pertencente à espécie *C. chloroleuca* (Moreira et al., 2016; Sun et al., 2018). Ensaios preliminares mostraram que isolados de dez espécies *Clonostachys* obtidos no Brasil possuem a capacidade de parasitar *Botrytis cinerea in vitro* (Moreira, 2012). A capacidade de algumas destas espécies em tolerar altas concentrações do fungicida tebuconazol também foi verificada (Freitas, 2017). Dessa forma, a avaliação da capacidade de isolados de diferentes espécies de *Clonostachys* em controlar doenças causadas por fungos, como a pinta preta da batata, pode ser vista como uma estratégia de triagem direcionada para fungos conhecidamente micoparasitas, o que, a princípio, pode aumentar as chances de identificação de candidatos promissores a agente de controle biológico, quando comparada com estratégias de triagem ‘massal’ que, não raramente, resultam na seleção de *Trichoderma* e/ou *Clonostachys* (e.g. Evans et al., 2003; Garcia et al. 2003; Jensen et al., 2007).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Obtenção e preservação dos isolados de *Alternaria grandis* e *Clonostachys* spp.**

Foram utilizados quatro isolados de *A. grandis* (Tabela 1) provenientes da coleção do laboratório de biologia de populações de patógenos (BIOPOP) do Departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Viçosa (DFP-UFV). Foram utilizados 20 isolados de *Clonostachys* spp. (Tabela 2), de diferentes substratos e localidades do Brasil, provenientes da Coleção Micológica de Lavras (CML), do Departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Lavras. Réplicas dos depósitos de todos os isolados de *Alternaria* e *Clonostachys* estão preservadas na coleção micológica da Unidade de Controle Biológico da Universidade Federal de Viçosa (UCBV-DFP-UFV).

**Tabela 1.** Isolados de *Alternaria grandis*

Isolado	Hospedeiro	Origem	Data de coleta
As 220	Batateira	Camanducaia, MG	2006
As 248	Batateira	Conselheiro Lafaiete, MG	2005
As 260	Batateira	Cristalina, GO	2005
As 588	Batateira	-	-

**Tabela 2.** Isolados de *Clonostachys* spp.

Isolado	Espécie	Substrato	Origem
UCBV07	<i>C. chloroleuca</i>	Solo, Cerrado nativo	Montividiu, GO
UCBV12	<i>C. chloroleuca</i>	Solo, campo de soja	Montividiu, GO
UCBV17	<i>C. chloroleuca</i>	Solo, Cerrado nativo	Montividiu, GO
UCBV26	<i>C. chloroleuca</i>	Solo, campo de soja	Montividiu, GO
UCBV92	<i>C. rogersoniana</i>	Briófita	Itumirim, MG
UCBV101	<i>C. rogersoniana</i>	Solo sob Araucária	São Paulo, SP
UCBV114	<i>C. rogersoniana</i>	Liteira	Barroso, MG
UCBV130	<i>C. rogersoniana</i>	Liteira Amazônica	Lavras, MG
UCBV10	<i>C. rosea</i>	<i>Theobroma cacao</i>	-
UCBV97	<i>C. rosea</i>	Liteira	Ilhéus, BA
UCBV133(NCR61)	<i>C. rosea</i>	<i>Prunus persica</i>	Viçosa, MG
UCBV01	<i>C. pseudochloroleuca</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	St. Rita de Caldas, MG
UCBV03	<i>C. pseudochloroleuca</i>	<i>Phoradendron perrottetii</i>	Lavras, MG
UCBV14	<i>C. pseudochloroleuca</i>	<i>Phoradendron perrottetii</i>	Lavras, MG
UCBV05	<i>C. pseudochloroleuca</i>	<i>Lychnophora pinaster</i>	Ingaí, MG
UCBV06	<i>C. rhizophaga</i>	Solo sob <i>Glycine max</i>	Montividiu, GO
UCBV34	<i>C. rhizophaga</i>	Solo, Cerrado nativo	Montividiu, GO
UCBV38	<i>C. rhizophaga</i>	Parasita, <i>Fusarium oxysporum</i>	Taquarituba, SP
UCBV132	<i>C. rhizophaga</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Cristalina, GO

### **3.2. Condução das plantas de batata em vasos**

Para a realização dos experimentos foram utilizados minitubérculos de batata da cultivar Ágata. Os minitubérculos, já com as brotações induzidas, foram adquiridos da empresa Multiplanta<sup>®</sup> e mantidos em câmara fria até o dia do plantio. Nos experimentos conduzidos em casa de vegetação, os minitubérculos foram plantados em vasos de 2 L contendo solo misturado ao substrato com terra de barranco e esterco bovino curtido, na proporção 3:1 respectivamente, adicionando-se 150 g de Osmocote<sup>®</sup> Classic 14-14-14 e 150 g de Yoorin para cada 60 L da mistura. Os tratos culturais e controle de pragas foram realizados de acordo com o recomendado para cultura da batata (Nick e Borém, 2017). As condições médias de temperatura e umidade na casa de vegetação foram  $\pm 25^{\circ}\text{C}$  e  $\pm 85\%$ , respectivamente.

### **3.3. Teste de patogenicidade em plantas de batata para seleção dos isolados de *Alternaria grandis***

O teste de patogenicidade foi realizado para a seleção de dois isolados mais virulentos de *A. grandis*, para, posteriormente, serem misturados e utilizados como inóculo nos testes de biocontrole com os isolados de *Clonostachys* spp. Os isolados de *A. grandis* foram crescidos em meio de cultura V8 CaCO<sub>3</sub> ágar (175 mL de suco V8, 3 g de CaCO<sub>3</sub>, 20 g de ágar e 825 mL de água destilada) em BOD a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , com fotoperíodo de 12 h. Após sete dias de incubação, foi adicionada água destilada esterilizada às placas e feita uma raspagem superficial do micélio com alça de Drigalski. As placas foram mantidas abertas sob luz negra por 8 h, seguidas por 16 h de escuro, por dois dias. O preparo da suspensão de conídios foi feito por meio da adição de água às placas, raspagem dos conídios com alça de Drigalski e filtração através de tecido do tipo voil. A suspensão foi ajustada a uma concentração de  $10^3$  conídios/mL pela contagem em hemacitômetro (Cardoso, 2010).

Foram inoculados discos foliares com 1 cm de diâmetro de folhas destacadas do baixeiro de plantas com 40 dias após o plantio (DAP). A inoculação foi feita por meio da deposição de uma gota contendo 10  $\mu\text{l}$  de suspensão e 0,1% de ágar sobre o disco de folha. Os discos foliares inoculados foram mantidos em câmara úmida no interior de caixas do tipo Gerbox (11x11x12,5 cm) contendo uma tela de nylon (malha de 2 mm) recoberto uma espuma de 1 cm de espessura umedecida com água destilada e autoclavada. A severidade da doença foi estimada a partir de medidas do maior

diâmetro das lesões, utilizando um paquímetro digital (Chaerani et al., 2007 modificado) até o momento em que pelo menos um dos isolados tenha causado necrose em toda a superfície do disco foliar.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com duas repetições (uma repetição = um Gerbox contendo cinco discos de folha). O controle foi a inoculação com água destilada mais 0,1% de ágar.

#### **3.4. Seleção dos isolados de *Clonostachys* para o controle da pinta preta na parte aérea de plantas de batata cultivadas em casa de vegetação**

O experimento foi conduzido em casa de vegetação. O delineamento foi inteiramente ao acaso com quatro repetições, a unidade experimental foi composta por uma planta de batata plantada em um vaso de 2 L. Os controles foram a inoculação unicamente da *A. grandis* e a pulverização com o fungicida Daconil® (Clorotalonil) Como referência de biocontrole, foi utilizado o isolado NCR61 (UCBV133) de *C. rosea* (Cota et al., 2008).

Os isolados de *Clonostachys* spp. foram reativados em meio aveia ágar e mantidos por sete dias a 25°C. Após o período, foi preparada uma suspensão de conídios para a inoculação de 10 g de arroz autoclavado com 60% de umidade, contidos em tubo falcon com tampão de algodão. Estes tubos foram mantidos por 10 dias a 25°C. Para as aplicações sobre as plantas de batata, as colônias de *Clonostachys* foram utilizadas em uma proporção de 20 g de arroz colonizado por litro de suspensão. Esta proporção foi baseada em resultados de experimentos prévios, nos quais foi observada que esta quantidade de arroz colonizado proporciona uma concentração variando de  $10^6$  a  $10^7$  conídios/mL, condizente com o padrão utilizado em experimentos envolvendo *Clonostachys* spp. no biocontrole (Silvera-Pérez et al., 2010; Jensen et al., 2016).

Após a incubação dos isolados de *Clonostachys* spp. por 10 dias sob temperatura e luz ambiente, a colônia crescida em arroz colonizado de cada isolado foi triturada, filtrada em tecido voil, a fim de separar as partículas grosseiras de arroz, e por fim diluída em 500 ml de 'água de arroz' (20 g/L), que foi cozido por 20 minutos e filtrado com voil. Por fim, foi adicionado 0,5% de sacarose, volume suficiente para a pulverização de quatro plantas. Após o preparo das suspensões, foi retirada uma alíquota de cada isolado para posterior contagem de conídios. O preparo da suspensão

de conídios dos isolados de *A. grandis* foi realizado conforme descrito no item 3.3, porém com uma concentração de  $10^4$  conídios/mL.

Foram feitas três aplicações dos isolados de *Clonostachys* spp. e do fungicida, com intervalo de sete dias. A primeira aplicação foi feita a 24 DAP. A aplicação foi feita por pulverização utilizando um atomizador AirPlus<sup>®</sup> acoplado a um compressor elétrico até o ponto de escorrimento foliar.

Dois dias após a última aplicação dos isolados de *Clonostachys* spp., plantas com 38 DAP foram inoculadas pela pulverização de uma suspensão contendo a mistura dos dois isolados mais agressivos de *A. grandis* em uma concentração de  $1 \times 10^4$  conídios/mL (Stammler et al., 2014). As plantas foram mantidas em câmara úmida composta por saco plástico umedecido, por um período de 48 h (Vloutoglou e Kalogerakis, 2000).

Para estimar a severidade, foram marcadas quatro folhas expandidas do terço inferior e médio por planta. Estas folhas foram fotografadas a cada três dias após a retirada da câmara úmida, totalizando três leituras, para posterior análise utilizando o software Fiji-ImageJ<sup>®</sup>. A porcentagem de desfolha das folhas previamente marcadas para avaliação também foi avaliada.

### **3.5. Controle biológico da pinta preta da batateira com isolados de *Clonostachys* spp. selecionados na triagem**

Para a avaliação da eficiência de cinco isolados promissores selecionados na triagem inicial, foi realizado outro ensaio em casa de vegetação. O delineamento foi inteiramente ao acaso com cinco repetições, a unidade experimental foi composta por uma planta de batata plantada em um vaso de 2L. Os controles foram a inoculação unicamente da mistura dos dois isolados de *A. grandis* e a pulverização com o fungicida Clorotalonil.

Realizaram-se três aplicações dos isolados de *Clonostachys* spp. e do fungicida com intervalo de sete dias, sendo a primeira aplicação realizada aos 42 DAP. A inoculação da mistura dos dois isolados *A. grandis* ( $1 \times 10^4$  conídios/ mL) foi feita 24h após a última aplicação dos isolados de *Clonostachys* spp, e as plantas foram incubadas por 48h em câmara úmida. A severidade foi estimada de acordo com a escala diagramática proposta por Duarte et al. (2013), a cada 48 h a partir de 4 dias após a inoculação (DAI), durante 8 dias. A ocorrência de desfolha também foi avaliada.

### **3.6. Avaliação da inibição de germinação de conídios de *Alternaria grandis* na presença de *Clonostachys* spp.**

A inibição da germinação de conídios de *A. grandis* foi avaliada na presença de suspensões de conídios e de seus filtrados livres de células dos isolados de *Clonostachys* spp. selecionados na triagem. Foram testados o triturado bruto obtido do cultivo dos isolados em arroz, na concentração de 20 g/L, e suspensões diluídas com concentrações de conídios ajustadas para  $10^3$  e  $10^6$  conídios/mL. Os filtrados das suspensões foram obtidos pela passagem de uma alíquota de 1 mL por um filtro de seringa com abertura de malha de 0,2  $\mu\text{m}$ . A suspensão de conídios da mistura de isolados do patógeno foi ajustada para  $7 \times 10^4$  conídios/mL. Foram depositadas três gotas de 10  $\mu\text{L}$  da suspensão do patógeno por lâmina de microscopia e alíquotas de igual volume de cada tratamento foram adicionadas sobre as gotas. O controle foi composto por gotas contendo 10  $\mu\text{L}$  da suspensão do patógeno mais 10  $\mu\text{L}$  de ‘água de arroz’. As lâminas foram condicionadas em bandejas forradas com papel umedecido e recobertas com papel alumínio e mantidas em BOD a 25 °C.

Foram preparadas três lâminas por tratamento, sendo retirada uma lâmina para avaliação após 6, 12, 24 h a partir da montagem do experimento. A fim de paralisar a germinação dos conídios do patógeno e facilitar a avaliação durante os tempos em questão, foi adicionado lactoglicerol sobre as gotas e posterior recobrimento com lamínulas. A avaliação da germinação foi feita por meio da contagem do número de conídios germinados observados no centro da lâmina com objetiva de 10x. A percentagem de conídios germinados foi calculada como:

$$G(\%) = (\text{n}^\circ \text{ de conídios germinados} / \text{n}^\circ \text{ total de conídios observados}) \times 100.$$

### **3.7. Análise estatística dos resultados dos experimentos**

Após a condução dos experimentos, os dados obtidos foram tabelados em editor de planilha Microsoft Excel e analisados por meio dos softwares R<sup>®</sup> e RStudio<sup>®</sup>. O procedimento para todos os conjuntos de dados foi iniciado pela análise exploratória, com plotagem de gráficos gerais a partir dos pacotes do R-base, seguida da organização feita com os pacotes *dplyr* e *tidyr*, e cálculo das variáveis-resposta de cada experimento. A AACPD da desfolha foi calculada com o pacote *agricolae* e a normalidade e homogeneidade, com o pacote *nortest*. Dado que as premissas de homogeneidade e normalidade não foram atendidas para nenhuma das variáveis, mesmo com as

transformações otimizadas do pacote *bestNormalize*, optou-se pelos testes não paramétricos de Kruskal-Wallis do pacote *easyanova* e pelo teste de medianas do pacote *agricolae*. O nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ , sendo os p-valores das comparações múltiplas ajustado pelo método BH. Finalmente, os gráficos construídos em R<sup>®</sup> empregaram os pacotes *ggplot2* e *ggpubr*.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Seleção dos isolados de *Clonostachys* para o controle da pinta preta em plantas de batata cultivadas em casa de vegetação

Foram realizadas três avaliações da severidade da pinta preta, aos 5, 8 e 11 DAI (Material suplementar Fig. 8), porém, devido à desfolha precoce, que resultou em perdas de dados, somente os dados da primeira leitura (5 DAI) foram usados para comparar os valores de severidade entre os tratamentos. Doze dos vinte tratamentos com *Clonostachys* resultaram em valores medianos de severidade próximos ao do controle com fungicida, sendo estes compostos por isolados das cinco espécies de *Clonostachys* testadas (Figura 1). Os isolados que proporcionaram menores valores de severidade foram, UCBV 17 (*C. chloroleuca*) e UCBV 38 (*C. rhizophaga*). Por outro lado, cinco tratamentos com *Clonostachys* resultaram em valores de severidade estatisticamente similares àqueles observados na testemunha (Figura 1).

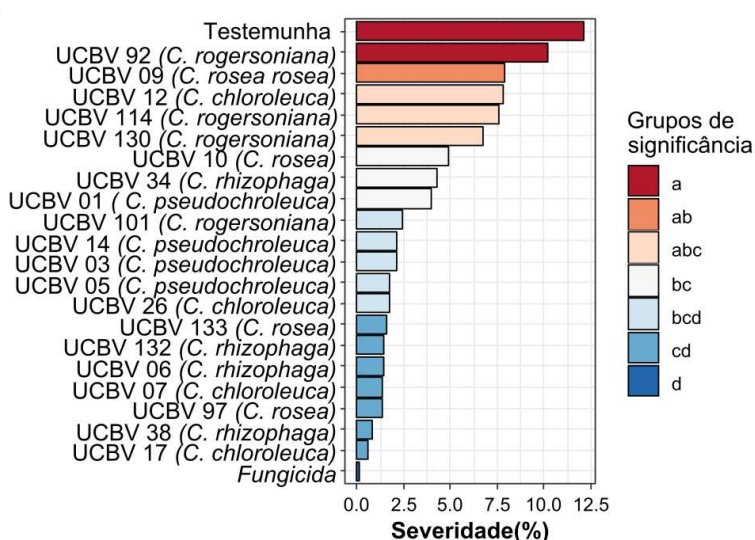
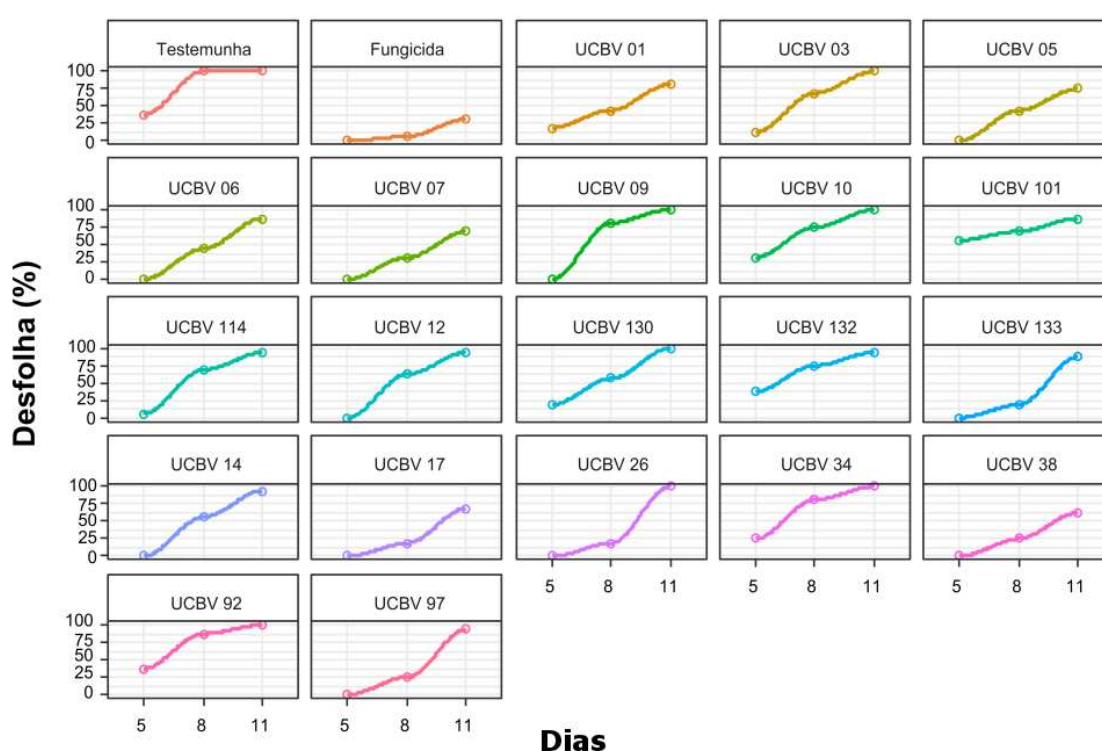


Figura 1. Teste de comparação das medianas para severidade da pinta-preta da batata aos 5 dias após a inoculação. Os valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente ( $P > 0,05$ ).

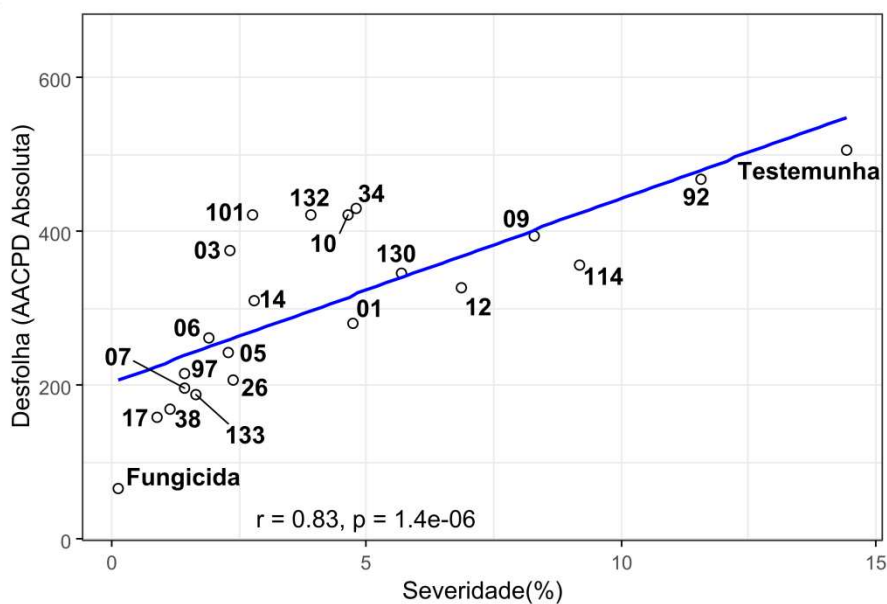
Como a inoculação da mistura dos dois isolados de *A. grandis* resultou em uma desfolha precoce e intensa das plantas, o percentual de desfolha foi calculado ao longo das três avaliações realizadas no experimento (Figura 2). Foi observado na testemunha desfolha completa já aos 8 DAI, sendo o valor máximo de desfolha das plantas tratadas com fungicida de 36% aos 11 DAI. Em nove tratamentos com *Clonostachys*, o índice de desfolha se manteve abaixo de 50% aos 8 DAI. Porém, aos 11 DAI, os índices de desfolha na maioria dos tratamentos variaram de 75 a 100%. As curvas de desfolha com as menores inclinações e os menores valores finais foram observadas nos tratamentos com os isolados de *Clonostachys* UCBV 07, UCBV 17 e UCBV 38.



**Figura 2.** Porcentagem de desfolha de plantas de batata tratadas com *Clonostachys* spp. e inoculadas com *Alternaria grandis* aos 5, 8 e 11 dias após a inoculação.

Os valores das áreas abaixo das curvas de desfolha foram usados em uma correlação com os valores de severidade calculados aos 5 DAI, permitindo uma análise conjunta dos dois tipos de resultados. A correlação foi positiva entre porcentagem de severidade aos 5 DAI e a desfolha ( $r$  de Spearman = 0,79) e a análise do gráfico de ajuste dos dados permitiu a identificação de um grupo de oito tratamentos com isolados de *Clonostachys* dispostos próximos ao controle com fungicida (UCBV 5, 6, 7, 17, 26,

38, 97 e 133) (Figura 3). Estes isolados pertencem a quatro das cinco espécies utilizadas no estudo. A partir destes resultados, foram selecionados quatro isolados para o ensaio de validação da eficiência de biocontrole: UCBV 5 (*C. pseudochroleuca*), UCBV 7 (*C. chloroleuca*), UCBV 38 (*C. rhizophaga*) e UCBV 133 (*C. rosea*). O isolado UCBV 101, de *C. rogersoniana*, foi adicionado aos quatro isolados selecionados para o segundo ensaio, já que este foi o único isolado desta espécie a figurar entre os melhores tratamentos na avaliação da severidade da doença (Figura 1).

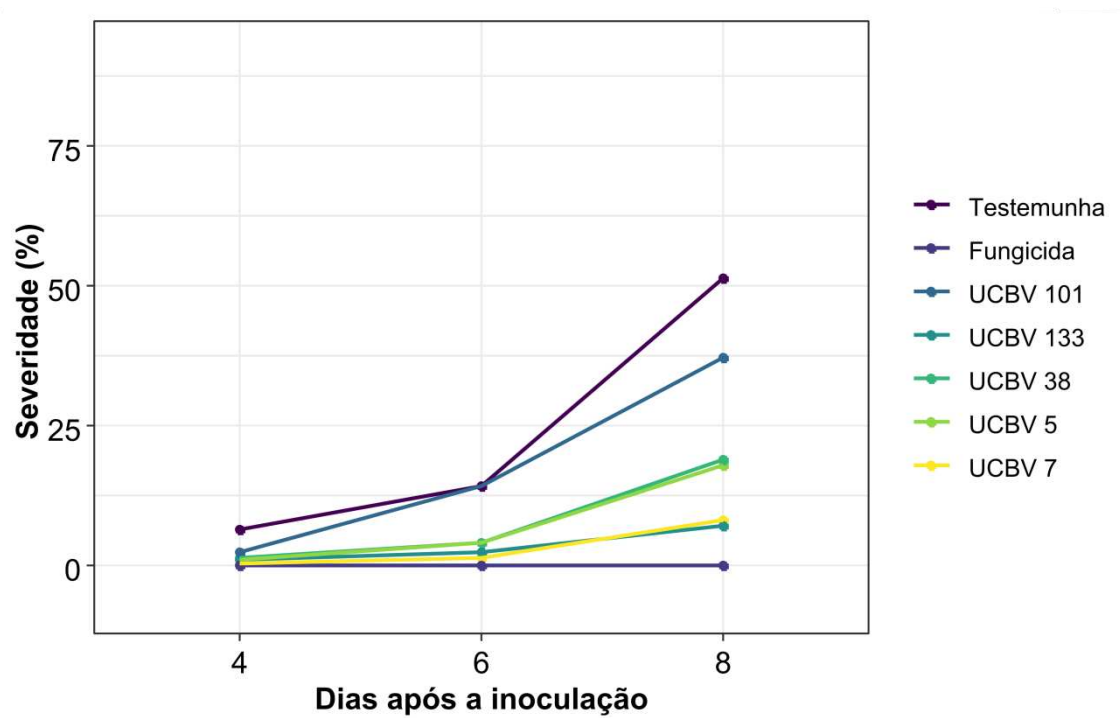


**Figura 3.** Correlação de Spearman entre os valores de área abaixo da curva de desfolha e os valores de severidade causados pela pinta preta da batateira aos 5 dias após a inoculação.

#### 4.2 Controle da pinta preta na batateira com isolados *Clonostachys* spp. selecionados na triagem

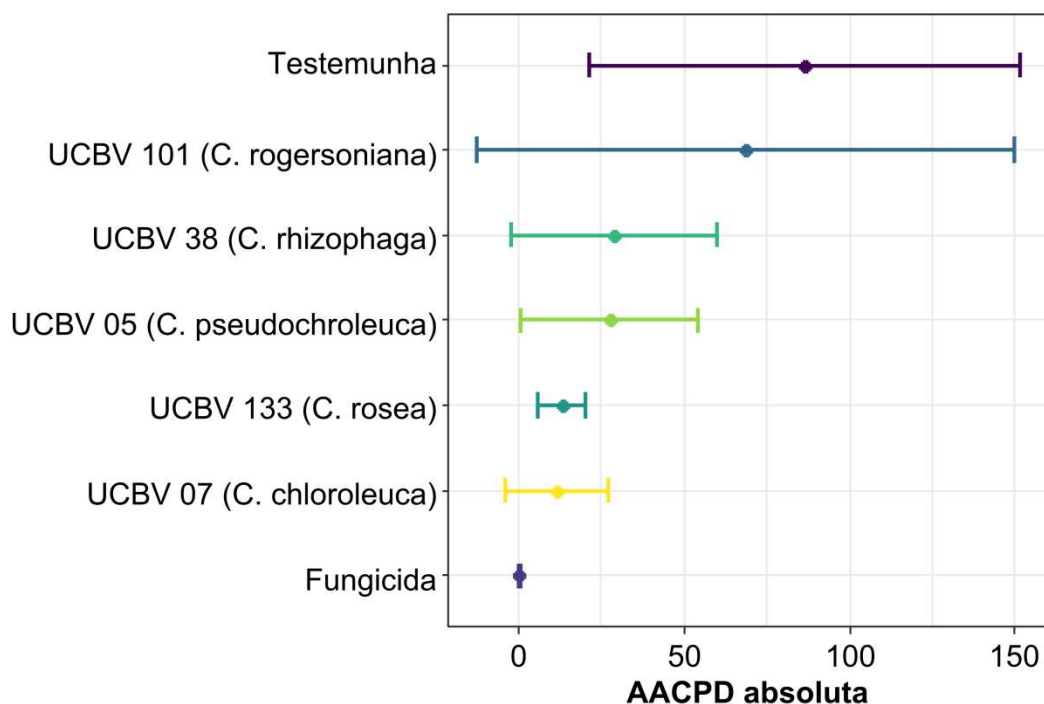
A curva de valores médios da severidade da pinta preta no tratamento testemunha apresentou uma inclinação acentuada, atingindo 51% ao fim do período de avaliação, aos 8 DAI (Figura 4). Esta foi seguida pela curva referente ao tratamento com o isolado UCBV 101. As curvas derivadas dos tratamentos com os isolados UCBV 133, UCBV 38, UCBV 5 e UCBV 7, mantiveram uma baixa inclinação e valores médios de severidade variando entre 1,5 e 4,2 % até a segunda leitura, aos 6 DAI. Já na terceira avaliação, foi possível observar a separação destes tratamentos em dois grupos, um composto pelos isolados UCBV 5 e UCBV 38, com valores médios de severidade de 18

e 19%, e o segundo composto pelos isolados UCBV 7 e UCBV 133, que mantiveram os valores de severidade em um patamar menor, entre 7 e 8%.



**Figura 4.** Progresso da severidade da pinta preta em plantas de batata tratadas com *Clonostachys* spp. ao longo de 8 dias após a inoculação de *Alternaria grandis*.

A comparação dos valores de área abaixo das curvas de progresso da severidade confirmou a tendência observada na análise temporal com os tratamentos contendo os isolados UCBV 7 e UCBV 133 com os menores valores e menor dispersão dos dados (Figura 5), estatisticamente comparáveis com os resultados do tratamento com o fungicida (Tabela 4). Estes foram seguidos pelos tratamentos com os isolados UCBV 5 e UCBV 38, que foram caracterizados por valores medianos inferiores aos do tratamento testemunha, mas com uma repetição discrepante cada. Os valores de área obtidos com UCBV 101 se sobrepuseram em grande parte com os resultados gerados para a testemunha (Figura 5).



**Figura 5.** Valores médios de intervalo de confiança da área abaixo da curva de progresso da pinta preta em plantas de batata tratadas com diferentes espécies de *Clonostachys* spp. e inoculadas com *A. grandis*.

**Tabela 3.** Teste de Kruskal-Wallis e agrupamento de médias e medianas da severidade da pinta preta na batateira aos 8 dias após a inoculação.

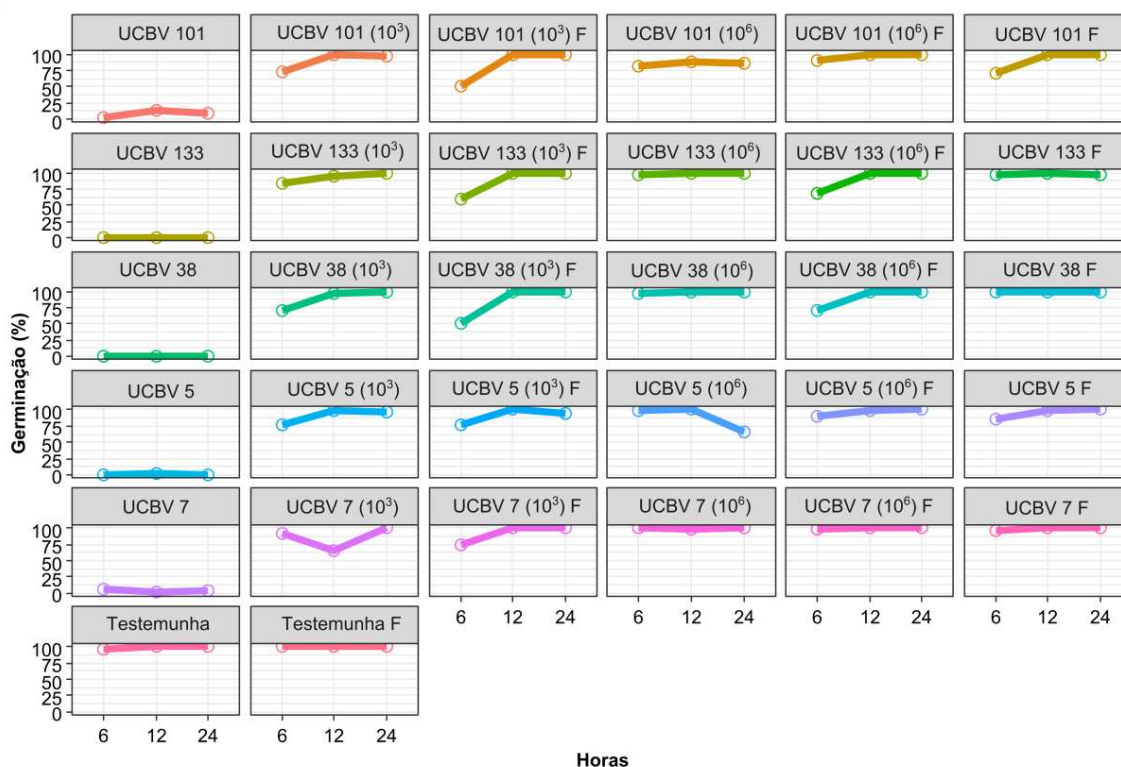
Tratamentos	Ranking	Média	Mediana	Ajuste BH*
Testemunha	29	51,55	28,3	a
UCBV 101	22	37,2	16,0	ab
UCBV 38	20	19,00	6,5	ab
UCBV 05	20	18,09	15,3	ab
UCBV 133	17,2	7,22	6,6	ab
UCBV 07	14,4	8,122	2,8	bc
Fungicida	3,4	0,13	0,0	c

\*Valores seguidos pela mesma letra na coluna, não diferem significativamente ( $p > 0,05$ ).

### 4.3 Avaliação da inibição de germinação de conídios de *Alternaria grandis* por suspensões e filtrados do cultivo de *Clonostachys* spp.

As suspensões de conídios dos isolados UCBV 133 e UCBV 38 inibiram a germinação de conídios de *A. grandis* em 100% em todos os tempos avaliados, quando preparadas na concentração de 20 g/L. Nesta concentração, as suspensões de conídios dos isolados UCBV 5 e UCBV 7 apresentaram valores médios de inibição superiores a 90% ao longo de todo o experimento. Estes valores foram inferiores no tratamento com UCBV 101 (Figura 6).

Já as suspensões de *Clonostachys* spp. ajustadas nas concentrações de  $10^3$  e  $10^6$  conídios/mL e os filtrados obtidos em todas as concentrações reduziram a porcentagem de germinação dos conídios de *A. grandis* apenas às 6 horas de avaliação. Após 12 e 24 horas, a taxa de germinação de *A. grandis* havia atingido valores próximos a 100% na maioria dos tratamentos com suspensões diluídas ou filtrados, indicando que esses tratamentos apenas atrasaram a germinação dos conídios do patógeno.



**Figura 6.** Porcentagem de germinação de conídios de *Alternaria grandis* incubados com suspensões de conídios ou filtrados (F) de cinco isolados de *Clonostachys* em três concentrações (suspensão bruta a 20 g/L,  $10^6$  e  $10^3$  conídios/mL).

## 5. DISCUSSÃO

A triagem de isolados de *Clonostachys* capazes de controlar a pinta preta foi baseada em ensaios conduzidos com plantas em casa de vegetação, sem a execução de ensaios preliminares de confronto *in vitro* entre antagonistas e patógeno. Tal estratégia é considerada mais apropriada, já que envolve o processo de doença e seus componentes principais (Jensen et al., 2007). Este procedimento, no entanto, é moroso quando comparado com os ensaios em placa de Petri, pois depende do cultivo prévio de plantas de batata e manutenção do seu vigor e sanidade por meses. Ao total, foram realizadas três triagens para o controle da pinta preta, com aproximadamente 24 isolados de *Clonostachys*. Porém, em dois experimentos, a ocorrência de infestação por ácaros, diagnosticada tardiamente, comprometeu o vigor das plantas, dificultando a avaliação após a inoculação com *A. grandis*. As plantas apresentaram folhas coriáceas com senescência e morte precoce. Assim, utilizaram-se os dados da terceira triagem, com 20 isolados de *Clonostachys*, para composição desta dissertação.

Os resultados da triagem suportam a hipótese do trabalho, de que a capacidade de antagonizar outros fungos e controlar doenças de plantas não se limita à espécie *Clonostachys rosea*, mas é um fenótipo comum deste gênero. Do total de 20 tratamentos compostos por isolados de *Clonostachys*, 12 resultaram em valores reduzidos de severidade da pinta preta, estatisticamente similares ao tratamento controle com fungicida aos 5 DAI. A não predominância de uma só espécie dentre os melhores tratamentos é indicativo de que, embora indivíduos de todas as espécies testadas sejam micoparasitas (Moreira, 2012) e capazes de controlar a pinta preta, estes variam em sua eficiência, o que justifica a execução de triagens.

Na triagem, as plantas sofreram uma desfolha intensa e rápida após a inoculação com *A. grandis*, fato não observado no segundo experimento em casa de vegetação, embora as condições experimentais adotadas tenham sido as mesmas. De fato, durante a triagem, já na segunda avaliação, aos 8 DAI, todas as plantas do tratamento testemunha estavam totalmente desfolhadas. Este fenômeno de desfolha precoce na triagem inicial não parece ter sido causado exclusivamente pela inoculação do patógeno, mas também por algum tipo de estresse fisiológico sofrido pelas plantas. Para conter uma infestação inicial de ácaros, as plantas foram pulverizadas por duas vezes com abamectina nos 15 dias que antecederam as pulverizações com *Clonostachys* spp. e posterior inoculação com *A. grandis*. A infestação foi contida, mas talvez o regime de aplicações do

acaricida tenha, de alguma forma, aumentado a suscetibilidade das plantas ao patógeno, o que resultou em rápida progressão das lesões e taxa de desfolha bem superior ao que geralmente é observado. Mesmo sob estas condições drásticas, alguns tratamentos com *Clonostachys* foram capazes de conter a rápida expansão das lesões e manter as folhas do terço inferior e médio das plantas por um período maior. A análise conjunta dos valores iniciais de severidade da pinta preta e da taxa de desfolha ao longo das três avaliações permitiu a identificação de um subgrupo composto por oito isolados de quatro espécies cujos efeitos se aproximaram aos dos observados com o tratamento com fungicida. A seleção de isolados dentro deste grupo foi arbitrária, escolhendo-se um de cada espécie. Um representante da espécie *C. rogersoniana* (UCBV 101) também foi adicionado à seleção, com base somente nos resultados de redução de severidade aos 5 DAI.

A biomassa de *Clonostachys* usada para aplicação foi obtida a partir do triturado de arroz colonizado pelos fungos. O cultivo sólido, em arroz, é comumente usado para o cultivo de fungos usados no controle biológico, até em cultivos comerciais (e.g. Dallemele-Giaretta et al., 2011). A modificação introduzida neste trabalho foi a utilização de todo o material colonizado e não apenas as suspensões de conídios obtidas pela lavagem do substrato (Cota et al., 2008; Borges et al., 2015). Tal estratégia foi adotada para facilitar a preparação das suspensões de vários isolados em um curto período de tempo e também serviu como um critério de seleção, pois a maioria dos isolados preparados desta forma resultaram em suspensões contendo conídios em concentrações na faixa de  $10^6$  a  $10^7$  propágulos/mL (Figura 7), valor considerado satisfatório em experimentos de otimização da produção de conídios por *C. rosea* (Carvalho et al., 2018) e suficientes para o controle efetivo do mofo cinzento em plantas de morango e tomate (Borges et al., 2015).

Três aplicações de *Clonostachys* foram feitas antes da inoculação de *A. grandis* na triagem e no segundo experimento com os isolados selecionados. A realização de mais de uma aplicação de proteção permitiu a simulação de uma estratégia de controle no campo, onde os melhores resultados com *C. rosea* (Cota et al., 2009) e outros agentes de controle biológico (e.g. Serenade - *Bacillus subtilis*, Sonata - *Bacillus pumilus*, MAPA, 2018) são obtidos com aplicações semanais. Outro objetivo desta estratégia foi possibilitar a colonização prévia das plantas pelos isolados de *Clonostachys* (Saraiva et al. 2014; Nordström, 2014), o que pode aumentar a eficiência

de controle quando comparada com apenas uma aplicação de proteção previamente à inoculação (e.g. Freitas, 2017; Saraiva et al., 2014).

As aplicações sucessivas de *Clonostachys* ao longo do tempo permitiram a manutenção da biomassa dos antagonistas em diferentes estágios de desenvolvimento no momento da inoculação de *A. grandis*, provavelmente resultando em diferentes formas de antagonismo e efeitos sobre a doença, como: recobrimento de porções da superfície foliar por conídios não germinados, com conseqüente inibição da germinação de *A. grandis* (Figura 6), ou conídios em germinação, que competirão por nutrientes com o patógeno (Jensen et al., 2016); parasitismo de *A. grandis* pelo micélio epifítico dos isolados de *Clonostachys* (Karlsson et al., 2015); ou até algum efeito indireto sobre a planta hospedeira durante a colonização endofítica destes (Nordström, 2014; Høyer et al., 2016).

O experimento realizado com os isolados de *Clonostachys* selecionados na triagem confirmou a eficiência de alguns destes em manter os valores de severidade em níveis reduzidos e atrasar o progresso da pinta preta de forma significativa. Os tratamentos com os isolados UCBV 5 e UCBV 38 resultaram em valores reduzidos de severidade da pinta preta até a segunda avaliação do experimento, mas não sustentaram este efeito na última avaliação. Já os tratamentos com UCBV 7 e UCBV 133 mantiveram os níveis de severidade reduzidos durante todo o experimento. O isolado de *C. rosea* UCBV 133 (=NCR1), previamente obtido em uma seleção de isolados de *C. rosea* para o controle do mofo cinzento (Nobre, 2005), foi usado como padrão de controle biológico, tendo os resultados confirmados a eficiência deste em controlar doenças de parte aérea (Morandi et al., 2001; Cota et al., 2008; Borges, 2015). O isolado UCBV 7 pertence à espécie *C. chloroleuca*, foi recentemente descrita a partir de isolados do Brasil (Moreira et al. 2016), caracterizada pelo rápido crescimento e intensa produção de conídios de cor esverdeada. O controle biológico de doenças por um isolado de *C. chloroleuca* (67-1) já foi descrito, embora este tenha sido erroneamente identificado como *C. rosea* até pouco tempo (Tian et al., 2014; Sun et al., 2015, 2018).

O teste de inibição de conídios de *A. grandis* com suspensões de conídios e filtrados das culturas de *Clonostachys* spp. resultou em efeito inibitório marcante somente com as suspensões preparadas com arroz colonizado triturado em água, na concentração de 20 g/L. Já os tratamentos com suspensões diluídas ou filtrados de todas as concentrações resultaram uma inibição parcial e temporária da germinação dos

conídios de *A. grandis*. Esses resultados indicam que altas concentrações de conídios de *Clonostachys* aplicados sobre as folhas podem inibir completa ou parcialmente a germinação e posterior penetração pelo patógeno, atuando na proteção da planta hospedeira. Além dessa inibição, o parasitismo dos conídios de *A. grandis* por hifas de *Clonostachys* também colabora para este efeito protetor (Liu et al., 2002; Moreira, 2012).

O efeito inibitório observado sobre *A. grandis* talvez seja resultado da auto-inibição de germinação de conídios de *Clonostachys*, a qual acaba tendo efeito antifúngico ou fungistático quando na presença de outras espécies (Lingappa e Lingappa, 1966; Chitarra et al., 2004). A natureza da substância ou substâncias responsáveis por essa inibição é desconhecida, mas parecem estar associadas à parede dos conídios e possuem natureza hidrofóbica, visto que não parecem ter sido extraídas de forma efetiva para o meio aquoso durante as diluições das suspensões e filtrações. Embora não tenham tido efeito significativo sobre a germinação de *A. grandis*, as suspensões diluídas e os filtrados de *Clonostachys* spp. induziram a alterações no número e morfologia dos tubos germinativos formados. De forma geral, os tubos germinativos do patógeno estavam menos melanizados, mais finos e menos ramificados, quando comparados com o controle (dados não apresentados), o que também deve contribuir para o efeito de biocontrole observado (Li et al., 2002).

Os resultados deste trabalho mostraram a viabilidade do uso de controle biológico com fungos antagonistas no manejo da pinta preta da batateira. Também demonstraram que a procura por isolados antagonistas eficientes podem ser ampliadas para as demais espécies do gênero *Clonostachys*, e não se restringe a *C. rosea*, o que aumenta as chances de sucesso. O controle oferecido pelos tratamentos com isolados selecionados de *Clonostachys* spp. foi satisfatório durante o período de avaliação, embora não diretamente comparável ao efeito do controle químico com fungicida, o que era esperado. A duração do efeito de biocontrole, seja pela inibição da germinação de *A. grandis*, parasitismo direto ou efeitos indiretos sobre a planta, é pequena e a viabilidade do seu uso dependente de aplicações sucessivas semanais. Os isolados selecionados neste estudo serão usados em uma próxima etapa deste projeto, onde o aumento da sobrevivência e persistência do efeito de biocontrole será investigado por meio de modificações no processo de produção de biomassa de *Clonostachys* e composição de formulações sólidas ou líquidas, associadas a ensaios em campo.

## 6. CONCLUSÕES

As espécies *C. chloroleuca* (UCBV 7, 17 e 26), *C. pseudochroleuca* (UCBV 5) e *C. rhizophaga* (UCBV 6, 38) foram tão eficientes quanto *C. rosea* (UCBV 97, 133) no controle da pinta preta na batateira em casa de vegetação.

Suspensões de conídios de *Clonostachys* spp. preparados com 20g/L inibiram a germinação de *A. grandis*.

## 7. REFERÊNCIAS

- Abdalla, S. A., Algam, S. A., Ibrahim, E. A., Naim, A. M. E. (2014). *In vitro* screening of *Bacillus* isolates for biological control of early blight disease of tomato in shambat soil. *World J. Agric. Res*, 2(2), 47-50.
- Abreu, L. M., Moreira, G. M., Ferreira, D.; Rodrigues-Filho, E., Pfenning, L. H (2014). Diversity of *Clonostachys* species assessed by molecular phylogenetics and MALDI-TOF mass spectrometry. *Fungal Biology*, 118, 1004-1012.
- Avenot, H., Morgan, D. P., Michailides, T. J. (2008). Resistance to pyraclostrobin, boscalid and multiple resistance to Pristine® (pyraclostrobin+boscalid) fungicide in *Alternaria alternata* causing alternaria late blight of pistachios in California. *Plant Pathology*, 57(1), 135-140.
- Basu, P. (1971). Existence of chlamydospores of *Alternaria porri* f. sp. *solani* as overwintering propagules in soil. *Phytopathology*, 61, 1347-1350.
- Borges (2015). Interação *clonostachys rosea* - *Botrytis cinerea* em morangueiros e mudanças metabólicas nas plantas. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, Brasil.
- Borges, Á. V.; Saraiva, R. M.; Maffia, L. A. (2015) Biocontrol of gray mold in tomato plants by *Clonostachys rosea*. *Tropical Plant Pathology*, 40, 71-76.
- Cardoso, C. R. (2010). Agressividade de *Alternaria tomatophila*, *A. grandis* e *A. solani* em batateira e tomateiro. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, Brasil.
- Carmo, E. L. (2009). Desempenho de cultivares nacionais e estrangeiras de batata em duas condições ambientais do Sul de Minas Gerais. *In: 49º Congresso Brasileiro de Olericultura, 2009, Águas de Lindóia-SP. 49º Congresso Brasileiro de Olericultura. Campinas-SP: Horticultura Brasileira, 27, 352-358.*
- Carvalho, A. L., de Rezende, L. C., Costa, L. B., de Almeida Halfeld-Vieira, B., Pinto, Z. V., Morandi, M. A. B., Medeiros, F. H. V., Bettiol, W. (2018). Optimizing the mass production of *Clonostachys rosea* by liquid-state fermentation. *Biological Control*, 118, 16-25.

- Chaerani R., Groenwold R., Stam P., Voorrips R. E. (2007). Assessment of early blight (*Alternaria solani*) resistance in tomato using a drop inoculation method. *Journal of General Plant Pathology*, 73, 96-103.
- Chatterton S., Jayaraman J., Punja Z. K. (2008). Colonization of cucumber plants by the biocontrol fungus *Clonostachys rosea* f. *catenulata*. *Biological Control* 46, 267-278.
- Chatterton, S., Punja, Z.K. (2009). Chitinase and b-1,3-glucanase enzyme production by the mycoparasite *Clonostachys rosea* f. *catenulata* against fungal plant pathogens. *Canadian Journal of Microbiology*, 55, 356–367.
- Chitarra, G. S., Abee, T., Rombouts, F. M., Posthumus, M. A., Dijksterhuis, J. (2004). Germination of *Penicillium paneum* conidia is regulated by 1-octen-3-ol, a volatile self-inhibitor. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2823-2829.
- Chowdappa P., Mohan Kumar S.P., Jyothi Lakshmi M., Upreti K.K. (2013). Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. *Biological Control* 65 (1): 109–117.
- Cota, L. V.; Maffia, L. A.; Mizubuti, E. S. G (2008). Brazilian isolates of *Clonostachys rosea*: colonization under different temperature and moisture conditions and temporal dynamics on strawberry leaves. *Letters in Applied Microbiology*, 46, 312-317.
- Cota, L.V., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G., Macedo, P.E.F. (2009). Biological control by *Clonostachys rosea* as a key component in the integrated management of strawberry gray mold. *Biological Control* 50, 222-230.
- Cwalina-ambroziak, B., Damszel, M. M., Glosek-sobieraj, M (2015). The effect of biological and chemical control agents on the health status of the very early potato cultivar Rosara. *Journal of Plant Protection Research*, 55, 4.
- Dallemole-Giaretta, R., Freitas, L. G., Caixeta, L. B., Xavier, D. M., Ferraz, S., Fabry, C. F. S. (2011). Produção de clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* em diferentes substratos. *Ciência e Agrotecnologia*, 35(2), 314-321.

- de Souza Dias, J. A. C. DE; Iamauti, M. T. Doenças da batateira. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J. A. M.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L. E. A. (1997) Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas, 2, 137-161.
- Dita Rodriguez, M. A., Brommonschenkel, S. H., Matsuoka, K., Mizubuti, E. S. G. (2006). Components of resistance to early blight in four potato cultivars: effect of leaf position. *Journal of Phytopathology*, 154(4), 230-235.
- Domsch, K. H., Gams, W., Anderson, T. H. (2007). *Compendium of soil fungi*, 2nd taxonomically revised edition by W. Gams. IHW, Eching. 672 p.
- Duarte, H. S S, Zambolim, L., Mizubuti, E. S. G., Pádua, J. G., Júnior, J. I. Ribeiro, Carmo, E. L., Júnior, A. F. Nogueira (2014). The field resistance of potato cultivars to foliar late blight and its relationship with foliage maturity type and skin type in Brazil. *Australasian Plant Pathology*, 41, 139-155.
- Duarte, H. S. S. Zambolim, L. Júnior, A. F N. Rosado, A. W. C. Cardoso, C. R. Paul, P.A. Mizubuti, E. S. G. (2013). Development and validation of a set of standard area diagrams to estimate severity of potato early blight. *European Journal of Plant Pathology*, 137, 249-257.
- Dubey, M. K., Jensen, D. F., Karlsson, M. (2014). An ATP-binding cassette pleiotropic drug transporter protein is required for xenobiotic tolerance and antagonism in the fungal biocontrol agent *Clonostachys rosea*. *Molecular Plant-Microbe interactions*, 27(7), 725-732.
- Dubey, M., Jensen, D. F., Karlsson, M. (2016). The ABC transporter ABCG29 is involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tolerance and biocontrol traits in the fungus *Clonostachys rosea*. *Molecular genetics and genomics*, 291(2), 677-686.
- Elad, Y. (2000). *Trichoderma harzianum* T39 preparation for biocontrol of plant diseases-control of *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Cladosporium fulvum*. *Biocontrol Science and Technology*, 10(4), 499-507.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2015). Sistema de Produção da Batata. Versão Eletrônica, 2.
- Evans, H. C., Holmes, K. A., Thomas, S. E. (2003). Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a

preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. *Mycological Progress*, 2(2), 149-160.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2015). *Statistical Pocketbook*. 236.

Fontenelle, A. D. B., Guzzo, S. D., Lucon, C. M. M., Harakava, R. (2011). Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp. *Crop Protection*, 30, 1492-1500.

Freitas, L. D. (2017). Comparação de Isolados de *Clonostachys* spp. no biocontrole de Giberela em espigas de trigo. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, Brasil.

Gannibal, P. B., Orina, A. S., Mironenko, N. V., Levitin, M. M. (2014). Differentiation of the closely related species, *Alternaria solani* and *A. tomatophila*, by molecular and morphological features and aggressiveness. *European Journal of Plant Pathology*, 139(3), 609-623.

García, R. A. M., Ten Hoopen, G. M., Kass, D. C., Garita, V. A. S., Krauss, U. (2003). Evaluation of mycoparasites as biocontrol agents of *Rosellinia* root rot in cocoa. *Biological Control*, 27(2), 210-227.

Ghini, R.; Kimati, H (2000). Resistência de Fungos a Fungicidas. Jaguariúna, SP: EMBRAPA, Meio Ambiente, 78.

Hoch, H. C. (1977). Mycoparasitic relationships: *Gonatobotrys simplex* parasitic on *Alternaria tenuis*. *Phytopathology*, 67, 309-314.

Hoyer, A. K., Jorgen, H., Jorgensen, L., Amby, D. B., Jensen, B. (2016). Endophytic colonisation of tomato plants by the biological control agent *Clonostachys rosea*. *Biological and integrated control of plant pathogens. IOBC-WPRS Bulletin*, 115, 101-106.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2018). Levantamento Sistemático da produção agrícola–Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil

- Ishii, H. (2006). Impact of fungicide resistance in plant pathogens on crop disease control and agricultural environment. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 40, 205-211.
- Jensen, B., Knudsen, I. M. B., Madsen, M., Jensen, D. F. (2004). Biopriming of infected carrot seed with an antagonist, *Clonostachys rosea*, selected for control of seedborne *Alternaria* spp. *Biological Control*, 94, 551-560.
- Jensen, B., Lubeck, P. S., Jorgensen, H. J. L. (2016). *Clonostachys rosea* reduces spot blotch in barley by inhibiting pre-penetration growth and sporulation of *Bipolaris sorokiniana*. *Pest Management Science*, 72, 2231-2239.
- Jensen, D. F., Knudsen, I. M., Mamarabadi, M., Hockenhull, J., Jensen, B. (2007). Development of a biocontrol agent for plant disease control with special emphasis on the near commercial fungal antagonist *Clonostachys rosea* strain 'IK726'. *Australasian Plant Pathology*, 36(2), 95-101.
- Juliatti, F. C., Juliatti, B. C. M, Figueiró, A. A. (2015). Resistência de fungos aos fungicidas na cultura da soja e do milho: evolução do problema no Brasil, aspectos moleculares e estratégias para o seu manejo correto e seguro. *Avanços da Fitopatologia no Agronegócio*, 151-204.
- Kapongo, J. P., Shipp, L., Kevan, P., & Sutton, J. C. (2008). Co-vectoring of *Beauveria bassiana* and *Clonostachys rosea* by bumble bees (*Bombus impatiens*) for control of insect pests and suppression of grey mould in greenhouse tomato and sweet pepper. *Biological Control*, 46(3), 508-514.
- Karlsson, M., Atanasova, L., Jensen, D. F., & Zeilinger, S. (2017). Necrotrophic mycoparasites and their genomes. *Microbiology Spectrum*, 5(2), 1-21.
- Karlsson, M., Durling, M. B., Choi, J., Kosawang, C., Lackner, G., Tzelepis, G. D., Nygren, K., Dubey, M. K., Kamou, N., Levasseur, G., Zapparata, A., Wang, J., Amby, D. B., Jensen, B., Sarrocco, S., Panteris, E., Lagopodi, A. L., Poggeler, S., Vannacci, G., Collinge, D. B., Hoffmeister, D., Henrissat, B., Lee, Y. W., Jensen, D. F. (2015). Insights on the evolution of mycoparasitism from the genome of *Clonostachys rosea*. *Genome Biology and Evolution*, 7, 465-480.

- Keyser, C. A., Jensen, B. Meyling, NV. (2015) Dual effects of *Metarhizium* spp. and *Clonostachys rosea* against an insect and a seed-borne pathogen in wheat. *Society of Chemical Industry*, 72, 517–526.
- Khan, N., Mishra, A., Nautiyal, C. S. (2012). *Paenibacillus lentimorbus* B-30488r controls early blight disease in tomato by inducing host resistance associated gene expression and inhibiting *Alternaria solani*. *Biological control*, 62(2), 65-74.
- Koch, E., Schmitt, A., Stephan, D., Kromphardt, C., Jahn, M., Krauthausen, H. J., Forsberg, G.; Werner, S., Amein, T., Whight, S. A. I., Tinivella, F.; Gullino, M. L., Roberts, S. J., Wolf, J. V., Groot, S. P. C. (2010). Evaluation of non-chemical seed treatment methods for the control of *Alternaria dauci* and *A. radicina* on carrot seeds. *European Journal of Plant Pathology*, 127, 99-112.
- Kosawang, C., Karlsson, M., Jensen, D. F., DilokpimoL, A., Collinge, D. B. (2014). Transcriptomic profiling to identify genes involved in *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol and zearalenone tolerance in the mycoparasitic fungus *Clonostachys rosea*. *BMC Genomics*, 55, 1-11.
- Landschoot, S., Vandecasteele, M., Carrette, J., De Baets, B., Höfte, M., Audenaert, K., Haesaert, G. (2017). Assessing the Belgian potato *Alternaria* population for sensitivity to fungicides with diverse modes of action. *European Journal of Plant Pathology*, 148(3), 657-672.
- Lanna Filho, R., Romeiro, da Silva Reginaldo, Alves, E. (2010). Bacterial spot and early blight biocontrol by epiphytic bacteria in tomato plants. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* (1977. Imprensa) 45, 1381-1387.
- Li, G. Q., Huang, H. C., Kokko, E. G., Acharya, S. N. (2002). Ultrastructural study of mycoparasitism of *Gliocladium roseum* on *Botrytis cinerea*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 43, 211-218.
- Lingappa, B. T.; Lingappa, Y. (1966). The nature of self-inhibition of germination of conidia of *Glomerella cingulata*. *Journal General of Microbiology*, 43, 91-100.
- Lourenço Jr. V, Moya A, González-Candelas F, Carbone I, Maffia LA, Mizubuti ESG, 2009. Molecular diversity and evolutionary processes of *Alternaria solani* in Brazil inferred using genealogical and coalescent approaches. *Phytopathology* 99, 765-774.

- Mamarabadi, M., Jensen, B., Jensen, D. F., Lübeck, M. (2008). Real-time RT-PCR expression analysis of chitinase and endoglucanase genes in the three-way interaction between the biocontrol strain *Clonostachys rosea* IK726, *Botrytis cinerea* and strawberry. FEMS microbiology letters, 285(1), 101-110.
- Manzer, F. E., Merriam D. C. (1974). Importance of overwintered early blight-infected potato vines in Maine. American Potato Journal 48, 419-420.
- Meng, J. ,Wang, X., Xu, D., Fu, X., Zhang, X., Lai, D., Zhang,G. (2016). Sorbicillinoids from fungi and their bioactivities. Molecules, 21(6), 715.
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2018). Agrofít–sistema de agrotóxicos fitossanitários.
- Miranda, B. E. Cardoso DE; Silva, R. V Da. (2017). Manejo de Doenças In Nick, C; Borem, A. Batata do plantio à colheita, 1, 126-153.
- Mógor, A. F. (2017). Exigências Climáticas e Ecofisiologia In Nick, C; Borem, A. Batata do plantio à colheita, 1, 20-35.
- Morandi, M.A.B., Maffia, L.A., Sutton, J.C., (2001). Development of *Clonostachys rosea* and interactions with *Botrytis cinerea* in rose leaves and residues. Phytoparasitica 29, 103-113.
- Moreira, G. M. (2012). Caracterização de espécies de *Clonostachys* e avaliação do parasitismo a *Botrytis cinerea*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG, Brasil.
- Moreira, G. M., Abreu, L. M., Carvalho, V. G., Schroers, H. J., Pfenning, L. H. (2016). Multilocus phylogeny of *Clonostachys* subgenus Bionectria from Brazil and description of *Clonostachys chloroleuca* sp. nov. Mycological Progress, 15(10-11), 1031-1039.
- Nick, C; Borem, A. (2017). Batata do plantio à colheita, 1, 221.
- Nobre, S.A.M., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G., Cota, L.V., Dias, A.P.S. (2005). Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. Biological Control, 34, 132-143.

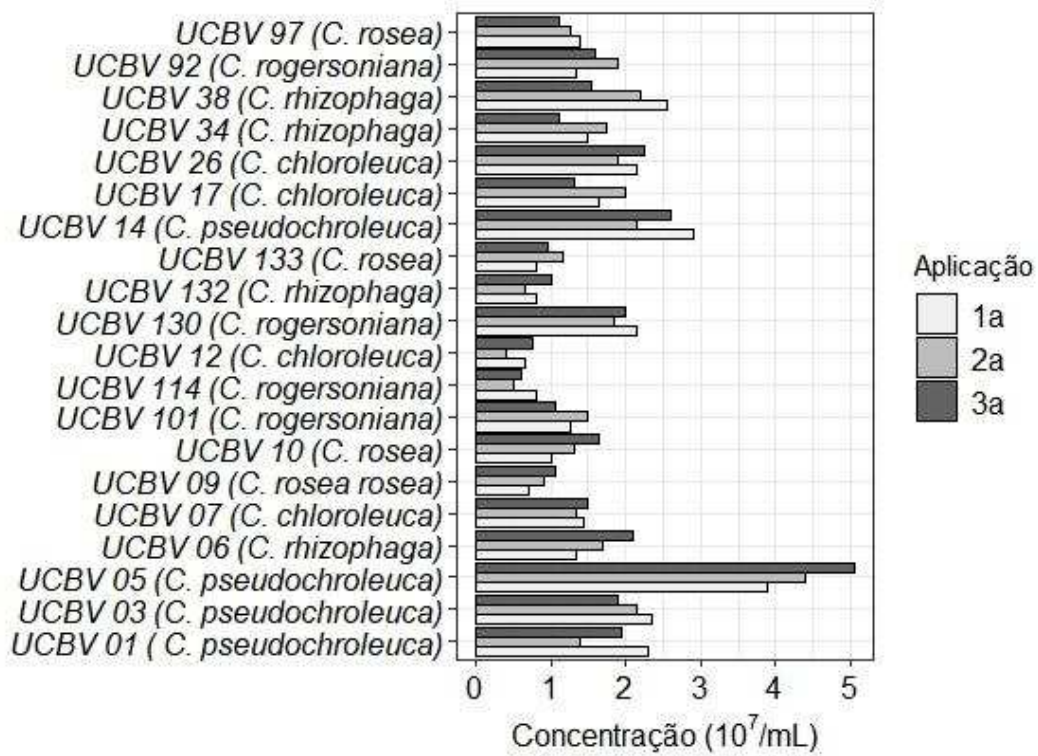
- Nordström, S. A. (2014). Endophytic growth of *Clonostachys rosea* in tomato and *Arabidopsis thaliana*. Independent project in biology. Dissertação de Mestrado, Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, Suécia.
- Odilbekov, F., Edin, E., Garkava-Gustavsson, L., Hovmalm, H. P., Liljeroth, E. (2016). Genetic diversity and occurrence of the F129L substitutions among isolates of *Alternaria solani* in south-eastern Sweden. *Hereditas*, 153(1), 10.
- Pane, C., & Zaccardelli, M. (2015). Evaluation of *Bacillus* strains isolated from solanaceous phylloplane for biocontrol of *Alternaria* early blight of tomato. *Biological control*, 84, 11-18.
- Patterson, C.L. (1991). Importance of chlamydospores as primary inoculum for *Alternaria solani*, incitant of collar rot and early blight on tomato. *Plant Disease*, 75(3), 274-278.
- Peeten M. G. H, Folkertsma S., Schipper J. K. , Baarveld H. R. & Klein S. (2011). Netherlands catalogue of potato varieties. The Hague, Nivap, 285.
- Pelletier, J.R. & Fry, W.E. (1989). Characterization of resistance to early blight in three potato cultivars: incubation period, lesion expansion rate, and spore production. *Phytopathology*, 79(5), 511-517.
- Ravnskov, S., Jensen, B., Knudsen, I. M. B., Bødker, L., Jensen, D. F., Karliński, L., Larsen, J. (2006). Soil inoculation with the biocontrol agent *Clonostachys rosea* and the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* results in mutual inhibition, plant growth promotion and alteration of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 3453-3462.
- Ribeiro, G.H.M.R., Samartini, C. Q., Silva, L. F. L., Vieira, S. D., Resende, L. V. (2017) . Batata do Plantio à Colheita, 1, 77-93.
- Ribeiro, J. D. R. (2011). A bataticultura em Minas Gerais – Os fatores de sucesso e de crise. *Horticultura Brasileira*, 29,S5901-S5910.
- Rodrigues, T. T. M. S., Berbee, M. L., Simmons, E. G., Cardoso, C. R., Reis, A., Maffia, L. A., Mizubuti, E. S. G. (2010). First report of *Alternaria tomatophila* and *A. grandis* causing early blight on tomato and potato in Brazil. *New Disease Reports*, 22, 28-28.

- Rodriguez, M. A., Cabrera, G., Gozzo, F. C., Eberlin, M. N., Godeas, A. (2011). *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. *Journal of Applied Microbiology*, 110, 1177-1186.
- Rotem J. (1994). The genus *Alternaria*: biology, epidemiology and pathogenicity. APS Press, 326.
- Saraiva, R.M., Czymmek, K.J., Borges, A.V., Caires, N.P., Maffia, L.A., (2014). Confocal microscopy study to understand *Clonostachys rosea* and *Botrytis cinerea* interactions in tomato plants. *Biocontrol Science and Technology* 25, 56-71.
- Schroers, H.J. 2001. A monograph of *Bionectria* (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and its *Clonostachys* anamorphs. *Studies in Mycology*. 46, 1-214. SENAR, Serviço Nacional de Aprendizagem Rural - MG. (2018). Aumento da demanda elevará a colheita de batata em Minas. Central de Comunicação da CNA, publicado em 24/01/2018. Disponível em: <http://www.cnabrazil.org.br/noticias/aumento-da-demanda-elevara-colheita-de-batata-em-minas>. Acesso em: 17/07/2018.
- Shtienberg, D, Fry, W. (1990). Influence of host resistance and crop rotation on initial appearance of potato early blight. *Plant Disease*, 74, 849-852.
- Silva, G.O., A Bortoletto, R. Ponijaleki, Mogor, A. F., S. Pereira. (2014) Comunicação Desempenho de cultivares nacionais de batata para produtividade de tubérculos, *Rev. Ceres*, Viçosa, 61 (5), 752-756.
- Silvera-Pérez, A. E., Valdebenito-Sanhueza, R. M., Duarte, V., Santos, H.P., Felippeto, J. (2010). Controle do mofo cinzento com *Clonostachys rosea* na produção de mudas de fúcsia. *Tropical Plant Pathology*, 35, 163-169.
- Souza Dias, J. A. C. De, Iamauti, M. T. Doenças da batateira. In: KIMATI, H.; Amorim, L.; Rezende, J. A. M.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L. E. A. (1997). *Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*, 2, 137-161.
- Stammler, G., Miessner, S., Böhme, F. (2014). Methods for inoculation of tomatoes and potatoes with *Alternaria solani* in the greenhouse and field. *Basf*, 2-5.

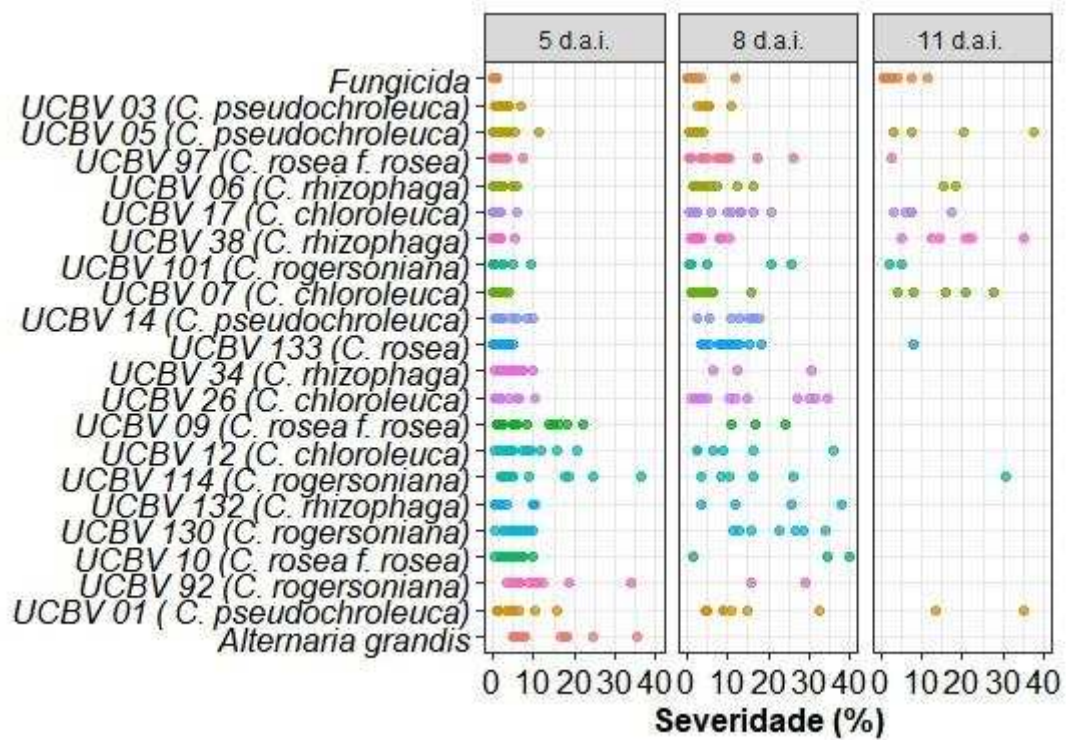
- Sterner, O., Thines, E., Eilbert, F., Anke, H. (1998). Glisoprenins C, D and E, new inhibitors of appressorium formation in *Magnaporthe grisea*, from cultures of *Gliocladium roseum*. *The Journal of antibiotics*, 51(2), 228-231.
- Sun, Z. B., Wang, Q., Zhang, J., Jiang, W. Z., Li, S. D., Ma, G. Z., Sun, M. H. (2018). The transcription factor-encoding gene *crtf* is involved in *Clonostachys chloroleuca* mycoparasitism on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Microbiological research*, 210, 6-11.
- Sun, Z. B., Li, S. D., Sun, M. H. (2015). Selection of reliable reference genes for gene expression studies in *Clonostachys rosea* 67-1 under sclerotial induction. *Journal of microbiological methods*, 114, 62-65.
- Sun, Z. B., Sun, M. H., Li, S. D. (2015b) Identification of mycoparasitism-related genes in *Clonostachys rosea* 67-1 active against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Scientific Reports*, 5, 1-10.
- Sutton, J. C., Li, D. W., Peng, G., Yu, H., Zhang, P., Valdebenito-Sonhueza, R. M (1997). *Gliocladium roseum*: a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Disease*, 81, 316-328.
- Tarantino, P., Caiazzo, R., Carella, A., Lahoz, E. (2007). Control of *Rhizoctonia solani* in a tobacco-float system using low rates of iprodione-and iprodione-resistant strains of *Gliocladium roseum*. *Crop Protection*, 26, 1298-1302.
- Tian, T., Li, S. D., Sun, M. H. (2014). Synergistic effect of dazomet soil fumigation and *Clonostachys rosea* against cucumber *Fusarium* wilt. *Phytopathology*, 104(12), 1314-1321.
- Töfoli, J.G., Melo, P.C.T., Domingues R.J., Ferrari J.T. (2013). Requeima e pinta preta na cultura da batata: importância, características e manejo sustentável. *Instituto Biológico, São Paulo*, 75 (1), 33-40.
- Tsuneda, A., & Skoropad, W. P. (1978). Behavior of *Alternaria brassicae* and its mycoparasite *Nectria inventa* on intact and on excised leaves of rapeseed. *Canadian Journal of Botany*, 56(11), 1333-1340.
- Turhan, G. (1993). Mycoparasitism of *Alternaria alternata* by an additional eight fungi indicating the existence of further unknown candidates for biological control. *Journal of Phytopathology*, 138(4), 283-292.

- Van Der Waals, J. E., Korsten, L., Aveling, T. A. S (2001). A review of early blight of potato African Plant Protection, 7, 91-102.
- Vloutoglou, I., Kalogerakis, S. N. (2000). Effects of inoculum concentration, wetness duration and plant age on development of early blight (*Alternaria solani*) and on shedding of leaves in tomato plants. Plant pathology, 49(3), 339-345.
- Wharton, P., Wood, E. (2013). Early blight biology and control in potatoes. University of Idaho Extension, 1196, 1-5.
- Woudenberg, J. H. C., Groenewald, J. Z., Binder, M., Crous, P. W. (2013). *Alternaria* redefined. Studies in mycology, 75, 171-212.
- Woudenberg, J. H. C., Truter, M., Groenewald, J. Z., Crous, P. W. (2014). Large-spored *Alternaria* pathogens in section Porri disentangled. Studies in mycology, 79, 1-47.
- Xue, A. G., Voldeng, H. D., Savard, M. E., Fedak, G., Tian, X., Hsiang, T (2009). Biological control of *Fusarium* head blight of wheat with *Clonostachys rosea* ACM 941. Canadian Plant Pathology, 31, 169-179.
- Zhai, M. M., Qi, F. M., Li, J., Jiang, C. X., Hou, Y., Shi, Y. P., Wu, Q. X. (2016). Isolation of secondary metabolites from the soil-derived fungus *Clonostachys rosea* YRS-06, a biological control agent, and evaluation of antibacterial activity. Journal of agricultural and food chemistry, 64(11), 2298-2306.

## 8. DADOS SUPLEMENTARES



**Figura 7.** Concentrações de conídios de *Clonostachys* spp. nas suspensões preparadas com arroz colonizado triturado em água em na concentração de 20 g/L nas três aplicações realizadas durante a triagem.



**Figura 8.** Porcentagem de severidade da pinta preta da batateira aos 5, 8 e 11 dias após a inoculação durante triagem com isolados de *Clonostachys* spp.