

FILIPPE CONSTANTINO BOREL

**INTERAÇÃO DE *Clonostachys rosea* E *Sclerotinia sclerotiorum* NO
SOLO E EM PLANTAS DE SOJA E FEIJÃO**

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
2014

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

T

B731i
2014 Borel, Filipe Constantino, 1986-
Interação de *Clonostachys rosea* e *Sclerotinia sclerotiorum*
no solo e em plantas de soja e feijão / Filipe Constantino Borel. –
Viçosa, MG, 2014.
vii, 28f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Luiz Antonio Maffia.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Mofo-branco. 2. Controle Biológico. 3. Pragas - Manejo.
4. Feijão - Doenças e pragas. 5. Soja - Doenças e pragas.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Fitopatologia. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia.
II. Título.

CDD 22. ed. 632.4

FILIPE CONSTANTINO BOREL

**INTERAÇÃO DE *Clonostachys rosea* E *Sclerotinia sclerotiorum* NO
SOLO E EM PLANTAS DE SOJA E FEIJÃO**

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: 26 de fevereiro de 2014

José Rogério de Oliveira

Cleide Maria Ferreira Pinto

Luiz Antonio Maffia
(Orientador)

Ofereço

A todos que me deram apoio.

A Jaqueline pelo amor e paciência.

Dedico

Aos meus amados pais, Júlio e Maria.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Em especial, aos meus pais Júlio e Maria pelo apoio, luta, dedicação e confiança na minha caminhada ao longo de toda minha vida. Aos meus irmãos, Jerônimo e Bruna pelo carinho e incentivos. Aos cunhados Anderson e Francine pelo apoio e amizade. A Jaqueline pelo carinho, amor e extrema paciência durante todo o tempo em que estivemos juntos.

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

A Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Fitopatologia e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela oportunidade, estrutura e pelo apoio financeiro.

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

Ao Eng. Agrônomo José Luiz, pelos conselhos e amizade.

Ao Prof. José Eustáquio e ao Técnico José Cupertino, pela doação das sementes de feijão e soja respectivamente.

A toda equipe de Pós-Graduação e Graduação do Laboratório de Epidemiologia e Controle Biológico pela amizade, descontração e auxílio durante o período.

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

Obrigado!

BIOGRAFIA

Filipe C. Borel, filho de Júlio José Borel e Maria da Conceição Constantino Borel, nasceu em 06 de setembro de 1986, em Manhuaçu, Estado de Minas Gerais.

Em 2005, ingressou no curso de Técnico em Agropecuária da Escola Agrotécnica Federal de Alegre (ES), graduando-se em dezembro de 2005.

Em 2007, ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa (MG), onde graduou-se em janeiro de 2012.

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

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Ciclo de vida e ecologia de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	2
2.2. Controle Biológico de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	4
2.2.1 <i>Clonostachys rosea</i> no biocontrole	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1. Germinação carpogênica de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em solo e areia, na presença de <i>Clonostachys rosea</i>	9
3.2. Sobrevivência de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , em diferentes condições de solo, na presença de <i>Clonostachys rosea</i>	10
3.3. Colonização de folhas e flores de plantas de soja e feijão por <i>Clonostachys rosea</i>	11
3.4. Emergência de plântulas de feijão de sementes infestadas por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e tratadas com <i>Clonostachys rosea</i>	12
4. RESULTADOS.....	12
4.1. Germinação carpogênica de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em solo e areia, na presença de <i>Clonostachys rosea</i>	12
4.2. Sobrevivência de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , em diferentes condições de solo, na presença de <i>Clonostachys rosea</i>	13
4.3. Colonização em folhas e flores de plantas de soja e feijão por <i>Clonostachys rosea</i>	14
4.4. Emergência de plântulas de feijão de sementes infestadas por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e tratadas com <i>Clonostachys rosea</i>	15
5. DISCUSSÃO	16
6. CONCLUSÕES	20
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21

RESUMO

BOREL, Filipe Constantino, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Interação de *Clonostachys rosea* e *Sclerotinia sclerotiorum* no solo e em plantas de soja e feijão.** Orientador: Luiz Antônio Maffia.

Sclerotinia sclerotiorum é patógeno importante, agente causal do mofo branco em várias culturas. O controle do patógeno é difícil, em vista da ampla gama de hospedeiros, carência de cultivares resistentes, produção de escleródios e dos problemas associados ao controle químico. Para avaliar o potencial do biocontrole do mofo branco nas culturas de soja e feijão, testou-se a eficiência de *Clonostachys rosea* em: i. reduzir a viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum*; ii, colonizar plantas das duas leguminosas; e iii. aumentar a emergência de sementes de feijão infectadas pelo patógeno. Avaliou-se a germinação carpogênica dos escleródios em solo e areia autoclavados; em ambos, o antagonista reduziu a germinação. Avaliou-se, também, a germinação carpogênica de escleródios armazenados em duas condições (ambiente de laboratório e em câmara fria) e enterrados em solo autoclavado, pasteurizado e natural. *Clonostachys rosea* reduziu a germinação carpogênica, independentemente das condições de armazenamento e de substrato de enterrio dos escleródios, mas não afetou a germinação miceliogênica. Após pulverizar suspensão de conídios de *C. rosea* na parte aérea de plantas de soja e feijão, detectou-se colonização do antagonista em tecidos foliares e florais de plantas de ambas as leguminosas. Imergiram-se sementes de feijão, infectadas por *S. sclerotiorum*, em suspensão de conídios de *C. rosea*, e houve aumento da emergência de plântulas. Assim, *C. rosea* foi efetivo em reduzir a germinação carpogênica de *S. sclerotiorum*, colonizou tecidos importantes para o desenvolvimento da doença nas plantas e aumentou a emergência de sementes infectadas. Nessa perspectiva, conclui-se que o antagonista tem potencial no bicontrol do mofo branco em soja e feijoeiro.

ABSTRACT

BOREL, Filipe Constantino, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2014. **Interaction of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Clonostachys rosea* in soil and in plants of soybean and common bean.** Adviser: Luiz Antônio Maffia.

Sclerotinia sclerotiorum is an important pathogen that causes the white mold on several crops. Pathogen control is difficult because of the wide host range, lack of resistant cultivars, production of sclerotia, and problems associated with the chemical control. To evaluate the potential of biocontrol of white mold in soybean and common bean crops, we evaluated the efficiency of *Clonostachys rosea* to: i. reduce the viability of sclerotia of *S. sclerotiorum*; ii. colonize plants of both leguminous; and iii. increase the emergence on bean from seeds infected with *S. sclerotiorum*. We evaluated the carpogenic germination of sclerotia in autoclaved soil and sand that were treated with *C. rosea*; in both, the antagonist reduced the germination. We also evaluated the germination of sclerotia that were stored under two conditions (laboratory and cold room) and buried in autoclaved, pasteurized, or natural soil treated with the antagonist. The carpogenic germination was reduced by *C. rosea* regardless of the sclerotia and soil treatments, whereas the myceliogenic germination was not affected. Conidial suspension of *C. rosea* was sprayed on soybean and bean plants, and samples of leaves and flowers were plated. The fungus was able to colonize the flowers and leaves of both leguminous. Bean seeds were infected with *S. sclerotiorum*, immersed in conidial suspension of *C. rosea*, and seeded in planting substrate. The treatment with the antagonist increased seedling emergence. Therefore, *C. rosea* reduced the carpogenic germination of *S. sclerotiorum*, colonized important tissues for white rot development in plants, and increased the emergence of seedlings from infected seeds. It is concluded that the antagonist is a potential biocontrol agent of white rot in soybeans and beans.

1. INTRODUÇÃO

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary, agente causal do mofo branco é um importante fitopatógeno que pode infectar mais de 400 espécies de plantas de diferentes famílias (Boland e Hall, 1994). O controle do mofo branco em soja e feijoeiro é difícil, pois há baixa disponibilidade de cultivares resistentes, o patógeno produz escleródios, que perduram por anos no campo, e há problemas associados ao controle químico (Bardin e Huang, 2001; Huang e Erickson, 2008; Steadman, 1983). No Brasil, em 1921 ocorreu o primeiro registro de *S. sclerotiorum* em São Paulo, em plantas de batata (Chaves, 1964), e até o final da década de 1980, o patógeno era relatado principalmente em hortaliças. O aumento no número de ocorrências e a dispersão do patógeno para outras culturas e regiões deram-se principalmente pela expansão da fronteira agrícola para o Cerrado e o plantio no período frio e seco do ano. A doença ganhou importância na cultura da soja, principalmente com os plantios continuados no mesmo local e rotação de culturas com espécies suscetíveis como feijoeiro, tomateiro, batateira, ervilha e algodoeiro (Garcia, 2008).

O mofo branco pode causar grandes perdas nas culturas da soja e feijoeiro. Nos Estados Unidos perdas anuais superam os 450 milhões de dólares (USDA, 2013). No Brasil, especialmente na cultura do feijão, a doença pode atingir 100% de incidência (Napoleão et al., 2005). Para a soja, na safra 2005/06, ocorreram perdas de 20% em Goiás; na safra 2007/08, a doença foi considerada mais severa e importante que a ferrugem asiática, principalmente porque o manejo da ferrugem é mais eficiente que o do mofo branco (Pomella et al., 2009). Embora faltem dados conclusivos sobre as perdas decorrentes da doença no Brasil, estima-se que possam atingir 70% em algumas culturas (Ferraz, 2012).

Como a maioria das cultivares de soja e feijão disponíveis aos agricultores tem resistência parcial ao fungo (Vuong et al., 2008), a aplicação de fungicidas é a alternativa mais usada no controle do mofo branco (Mueller et al., 2002). Entretanto, o custo envolvido é alto, pois demanda-se grande número de aplicações para cobrir o período de liberação dos ascósporos (Abawi e Grogan, 1979; Clarkson et al., 2004). Ademais, a maioria dos fungicidas não controla a germinação dos escleródios no solo, e atua principalmente no controle das infecções aéreas por ascósporos (Huang e Erickson, 2008).

Tem-se investigado novas estratégias de manejo da doença para redução de inóculo. A adoção de medidas culturais, como o plantio direto na palhada (Ferguson e Shew,

2001; Ferraz, 1999), manejo do espaçamento (Paula Junior, et al., 2009), rotação de culturas e pousio das áreas infestadas pode reduzir a intensidade da doença no campo (Gracia-Garza et al. 2002; Rousseau et al. 2007), apesar de se questionar a eficiência, visto o tempo de permanência dos escleródios no solo (Adams e Ayers, 1979). Considerando-se a busca de redução do controle químico, demandam-se alternativas de controle de fitopatógenos, especialmente daqueles que sobrevivem no campo por longo tempo (Whipps et al., 2007). Nessa perspectiva, o controle biológico é alternativa promissora para o controle de *S. sclerotiorum* (Huang, 1991; Zadoks, 1993). Há mais de 30 espécies de fungos e bactérias relatados como antagonistas a *Sclerotinia* spp. (Adams e Ayres, 1979), como *Clonostachys rosea* (Rodriguez et al., 2011; Chaves, 2011; Huang, 1978; Xue, 2003; Tu, 1989). Isolados do fungo controlaram *Botrytis cinerea* em morangueiro (Cota et al., 2008a), roseira (Morandi, 2003) e fúcsia (Silvera-Pérez, 2010). Tem-se testado pouco o antagonismo de *C. rosea* a *S. sclerotiorum*. A germinação miceliogênica de escleródios do patógeno reduziu-se na presença de *C. rosea* em solo esterilizado (Chaves, 2011).

Embora seja uma estratégia promissora, demandam-se mais conhecimentos básicos sobre os efeitos de *C. rosea* na viabilidade dos escleródios do patógeno e nas infecções de plantas de feijão e soja. Assim, considerando-se a importância do mofo branco e a dificuldade de manejo da doença, estudou-se o potencial do controle biológico de *S. sclerotiorum* por *C. rosea*, avaliando-se a eficiência do antagonista em reduzir a sobrevivência e germinação dos escleródios, colonizar tecidos de plantas de soja e feijão e de aumentar a emergência de sementes de feijão infectadas com *S. sclerotiorum*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ciclo de vida e ecologia de *Sclerotinia sclerotiorum*

Sclerotinia sclerotiorum é patógeno necrotrófico agressivo, que pode incitar sintomas característicos, muitas vezes não diferenciáveis no início das infecções, mas que com o progresso da doença aparentam ser semelhantes para quase todas as espécies das hospedeiras. Os sintomas podem ser: podridões e necroses da haste, lesões encharcadas de folhas, flores e vagens ou podridão radicular. Tipicamente, o patógeno produz micélio branco cotonoso que se desenvolve nos tecidos do hospedeiro, onde posteriormente formam-se estruturas de sobrevivência, os escleródios.

O patógeno pode se dispersar através de sementes infectadas por micélio ou em lotes de sementes com escleródios. Sementes infectadas por *S. sclerotiorum* são um problema grave, pois o patógeno geralmente encontra-se latente nelas na forma de micélio, e pode sobreviver por até três anos nos cotilédones (Tu, 1997). O fungo pode permanecer no solo, sob condições desfavoráveis, como escleródios ou em resíduos de plantas e materiais orgânicos. Escleródios podem sobreviver no solo ou em restos de culturas entre 5 a 8 anos (Steadman, 1983; Adams e Ayers, 1989) e desempenham papel importante no ciclo da doença, pois são as estruturas primárias de sobrevivência. A permanência longa dos escleródios no solo assegura a fonte de inóculo inicial (Steadman, 1983; Willets e Wong, 1980; Bolton et al., 2006).

A incidência do mofo branco é favorecida pela alta densidade de plantio, períodos prolongados de precipitação, elevada umidade do ar e temperaturas entre 10 a 20°C (Purdy, 1979; Illipronti e Machado, 1993; Dhingra et al., 2009). Estas condições são favoráveis pois, em geral, sob temperatura e umidade adequadas, ocorre a germinação dos escleródios, que pode ser miceliogênica ou carpogênica. Na germinação miceliogênica, há produção de hifas que podem infectar os tecidos da planta diretamente (Bardin e Huang, 2001; Bolton et al., 2006). Embora sejam infecções importantes, o micélio oriundo desta germinação geralmente infecta plantas hospedeiras próximas aos escleródios. Por outro lado, as infecções a longa distância provavelmente dão-se por ascósporos (Newton e Siqueira, 1972; Abawi e Grogan, 1975). Na germinação carpogênica, há produção de apotécios que originam os ascos com ascósporos, os quais podem infectar diferentes órgãos das plantas (Schwartz e Steadman, 1978). A germinação carpogênica é considerada o principal componente para ocorrência de epidemias da doença (Abawi e Grogan, 1975; Boland e Hall, 1988; Foster et al., 2011; Cook et al., 1975), pois os apotécios liberam ascósporos continuamente de 2 a 17 dias, com uma média aos 9 dias, podendo haver produção de cerca de dois milhões de ascósporos (Schwartz e Steadman, 1978).

Os ascósporos depositam-se sobre flores senescentes, e o fungo utiliza esta fonte de nutrientes para iniciar a infecção da planta. Em plantas de soja e feijão (Cline e Jacobson, 1983; Boland e Hall, 1988; Caesar e Pearson, 1983), as infecções ocorrem durante o período reprodutivo, e a doença está intimamente ligada ao florescimento (Steadman, 1983; Markell et al., 2010). Embora a doença possa ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento dessas leguminosas, o período entre a plena floração e início da formação das vagens é crítico para as infecções (Dhingra, et. al., 2009). Ascósporos do patógeno caem nas pétalas e germinam na presença de água livre. A

infecção progride com o crescimento do micélio dentro dos tecidos macerados pelo ácido oxálico produzido pelo patógeno (Abawi e Grogan, 1975; Boland e hall, 1988). Eventualmente, hastes e pecíolos são infectados, tecidos vasculares são interrompidos e caules, vagens ou folhas fora do local de infecção morrem. Embora rara, pode haver a infecção da parte aérea através de ferimentos e contato com outras plantas doentes (Grau e Hartman, 1999). Com a exaustão dos nutrientes, o micélio fúngico começa a agregar-se formando os escleródios, dentro ou fora das hastes (Kurle et al. 2001).

2.2. Controle Biológico de *Sclerotinia sclerotiorum*

O controle biológico de doenças causadas por patógenos do solo é complexo, pois a supressão de doenças de plantas baseia-se em interações do hospedeiro, patógeno, agente de biocontrole e a comunidade microbiana (Handeisman e Stabb, 1996). As mudanças rápidas de pH, potencial osmótico e do solo e a alta atividade microbiana que acontecem na rizosfera influenciam o antagonismo e podem prejudicar a sobrevivência de antagonistas. Para aumentar a eficiência do biocontrole, demanda-se entender o ambiente de interação, bem como os mecanismos de ação dos antagonistas e sua interação com patógenos. (Handeisman e Stabb, 1996; Fravel, 2005).

“A redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença por um ou mais organismos, realizado naturalmente ou através da manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonista, ou pela introdução em massa de um ou mais antagonistas”, proposta por Baker e Cook (1974), é definição clássica do controle biológico de fitopatógenos. A importância do biocontrole no manejo de fitopatógenos de difícil controle tem aumentado, em vista da baixa eficiência das técnicas rotineiramente empregadas e/ou da pressão em reduzir o consumo de fungicidas químicos. Ademais, a resistência a fungicidas, longos períodos de sobrevivência e a grande gama de hospedeiros de *S. sclerotiorum* têm atraído o interesse nas alternativas mais estáveis e sustentáveis no manejo da doença (Gossen et al., 2001; Boland e Hall, 1994; Fravel, 2005).

A sobrevivência de estruturas de resistência no solo, como os escleródios, é mais significativamente afetada pelos componentes biológicos do solo (Ayers e Adams, 1979). Muitos microrganismos estão associados ao biocontrole de *S. sclerotiorum*, principalmente bactérias e fungos. Entre as bactérias, espécies de *Pseudomonas*, *Bacillus* (Fernado et al., 2006; Gao et. al., 2013) e *Streptomyces* sp. estão associadas à redução da germinação dos escleródios do patógeno. Entre os fungos, *Aspergillus* spp.,

Penicillium spp., *Fusarium* spp., *Mucor* spp., *Sporidesmium sclerotivorum* e *Teratosperma oliglocadium* (Schwartz e Steadman, 1989), *Paecilomyces lilacinus*, *Coniothyrium minitans*, *Clonostachys rosea* e várias espécies de *Trichoderma* (Whipps e Budge, 1990) são relacionados ao micoparasitismo e/ou inibição do patógeno. Outros microrganismos do solo são também descritos como parasitas de escleródios (Tu, 1997).

Trichoderma spp. e *C. rosea* têm grande potencial para o biocontrole de doenças de plantas como o mofo branco (Papavizas, 1985; Sutton, 1995). A produção de metabólitos secundários, hiperparasitismo e competição por espaço e nutrientes, comuns aos dois fungos, provavelmente são os mecanismos mais importantes no controle de *S. sclerotiorum*.

O gênero *Trichoderma* abrange grande número de espécies, há muito relacionadas ao biocontrole (Howell, 2003). Estas espécies são muito comuns na agricultura, florestas, restingas, e em quase todos os habitats naturais e solos, em todas as zonas climáticas do mundo (Danielson e Davey, 1973; Roiger, et al., 1991; Harman et al., 2004). Já se visualizou o fungo colonizando a superfície das raízes de diversas plantas (Parkison et al., 1963), escleródios e propágulos de outros fungos (Weels et al., 1972; Davet, 1979). *Trichoderma* spp. são competidores agressivos, colonizam rapidamente diferentes substratos, competem com os patógenos por nutrientes, têm grande capacidade parasitária e podem atuar por antibiose, indução de resistência e inativação de enzimas (Ozbay et al., 2004; Shores et al., 2010). Algumas espécies produzem metabólitos secundários tóxicos a patógenos, e compostos voláteis e não voláteis reduziram o crescimento micelial e a germinação de *S. sclerotiorum* (Kapil e Kapoor, 2005).

Micoparasitas necrotróficos como *Trichoderma* spp. são eficazes no controle de patógenos do solo, como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium oxysporum* e *F. culmorum*, em casa de vegetação e campo (Chet e Imbar, 1994). *Trichoderma harzianum* controlou vários fungos fitopatogênicos formadores de escleródios (Hadar et al., 1979; dos Santos e Dhingra, 1982; Elad et al., 1982). O micoparasitismo é importante no controle de *S. sclerotiorum*, e se visualizaram as interações de *Trichoderma* spp. e fungos fitopatogênicos do solo por microscopia de fluorescência e eletrônica (Elad et al., 1983). Trutmann e Keane (1990) demonstraram o parasitismo de *S. sclerotiorum* por *T. koningii* e o potencial do antagonista em controlar o mofo branco em feijoeiro. Ojaghian (2011) estudou o potencial de *T. asperellum*, *T. ceramicum*, *T. andinensis*, *T. orientalis*, *T. atroviride*, *T. viridescens*, *T. brevicompactum*, *T. harzianum*, *T. virens*, *T. koningii* e *T. koningiopsis* no controle

biológico de *S. sclerotiorum*. *In vitro*, todas as espécies reduziram a formação de escleródios e inibiram o crescimento radial do patógeno. Para os autores *T. ceramicum*, *T. orientalis*, *T. atroviride* e *T. viridescens*, *T. virens*, *T. koningii* e *T. koningiopsis* promoveram a lise dos escleródios. Os autores observaram que, em casa de vegetação, *T. koningii*, *T. virens*, *T. ceramicum* e *T. viridescens* reduziram significativamente a severidade e, no campo, *T. viridescens* e *T. ceramicum* reduziram a incidência do mofo branco em batateira.

Observou-se antagonismo a *S. sclerotiorum* e *Fusarium solani* f sp. *phaseoli*, por *Trichoderma* spp. obtidos de 40 amostras de solo do Rio Grande do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Goiás e Tocantins. (Louzada et al., 2009) Nem todos os isolados testados atuaram como hiperparasitas, o que sugere que outros mecanismos, como antibiose e competição, estivessem envolvidos no antagonismo aos patógenos. O isolado T39 de *T. harzianum*, base do produto comercial Trichodex 20SP, reduziu a mortalidade de plantas de pepino, o progresso do mofo branco e o número de apotécios de *S. sclerotiorum*, quando aplicado em palhada de *Brachiaria ruziziensis*, em lavouras de soja (Görge, 2009). Para os autores, a colonização dos escleródios foi diretamente proporcional ao aumento na concentração do antagonista.

No mundo, há mais de 50 produtos comerciais à base de *Trichoderma* (Pomella et al., 2009). Apesar do grande número, a eficiência dos produtos depende da viabilidade e da concentração adequada do agente (Fravel, 2005).

2.2.1 *Clonostachys rosea* no biocontrole

Clonostachys rosea (Link Fries) [forma perfeita = *Bionectria ochroleuca*], anteriormente classificado como *Gliocadium roseum*, é micoparasita eficiente de muitos fitopatógenos (Schoers et al., 1999). O antagonista ocorre naturalmente no solo, restos culturais e plantas daninhas, em regiões temperadas, tropicais e desérticas (Nobre et al., 2005; Sutton et al., 1997). O fungo pode colonizar raízes, hastes, vagens, folhas e sementes de diversas espécies de plantas, como soja (Schiller e Sinclair, 1984), trevo vermelho, morango e framboesa (Sutton et al., 1997). Como grande vantagem evolutiva, pode se estabelecer endofiticamente em tecidos verdes em espécies de plantas (Sutton et al., 1997; Morandi et al., 2001).

O antagonista pode atuar por diferentes mecanismos, como antibiose, competição, hiperparasitismo, produção de enzimas líticas e indução de resistência. O fungo já foi associado a cistos de *Heterodera* spp., *Globodera* spp. e outros nematoides. É relatado

também controlando *Botrytis cinerea* (Sutton et al., 1997; Morandi et al., 2001; Nobre et al., 2005; Morandi et al., 2006; Cota et al., 2008ab; Morandi et al., 2008), *Fusarium culmorum* (Jensen et al., 2000; Roberti et al., 2008, Mamarabadi et al., 2009), *Erysiphe orontii* (Lahoz et al., 2004), *Pythium* spp. (Correa et al., 2010), *S. sclerotiorum* (Rodriguez et al., 2011), *Phytophthora palmivora*, *Alternaria radicina*, *A. dauci*, *A. alternata*, *F. oxysporum* f. sp. *pisi*, *F. solani* f. sp. *pisi*, *Aphanomyces euteiches*, *Moniliophthora roreri*, *M. perniciosa*, *Mycosphaerella pinodes* e *Rhizoctonia solani* (Xue, 2003).

Clonostachys rosea produz enzimas que degradam compostos da parede celular (quitina, glucanos e celulose) e inibem o crescimento micelial de *Fusarium culmorum* e *Pythium ultimum* (Mamarabadi et al., 2009). Estes autores caracterizaram o gene codificador N-acetyl- β -d-glucosaminidase, *cr-nagl*, responsável pela atividade quitinolítica do fungo, sendo o primeiro gene dessa natureza descrito para *C. rosea*, e observaram a alta expressão de *cr-nagl* nas interações *C. rosea* – *F. culmorum*. Embora secreta quitinohidrolases, envolvidas no micoparasitismo e degradação da parede celular dos patógenos, em vista da interação com *Pythium ultimum*, sugeriu-se que o antagonista use outro mecanismo para degradar a parede celular de oomicetos (Mamarabadi et al., 2009).

O fungo controlou *S. sclerotiorum* em plantas de soja e alface em vasos, sob condições controladas (Rodriguez et al., 2011). O isolado BAFC3874 produziu compostos do metabolismo secundário que reduziram o crescimento micelial do patógeno em placas de Petri, promovendo o colapso de protoplasma e deficiência na formação de melanina de hifas do patógeno (Rodriguez et al., 2011). Para os autores, *C. rosea* atua principalmente por antibiose, produzindo compostos antifúngicos associados ao metabolismo secundário, e por micoparasitismo.

Comprovou-se o micoparasitismo de *C. rosea* na redução de doenças causadas por *M. roreri*, *M. perniciosa* e *Phytophthora palmivora* (Krauss e Soberanis, 2001). Para os autores, este mecanismo era importante no controle dos patógenos, quando os isolados de *C. rosea* foram aplicados individualmente ou em conjunto. No Canadá, o isolado ACM941 do antagonista parasitou *Alternaria alternata*, *Aphanomyces euteiches*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*, *F. solani* f. sp. *pisi*, *Mycosphaerella pinodes*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, e *S. sclerotiorum*, fungos que causam o complexo de podridão radicular da ervilha, principal fator limitante da cultura (Xue, 2003). Em condições controladas, a aplicação do antagonista nas sementes de ervilha aumentou a germinação em 44% e a emergência em 22%. Reduziu-se a severidade da doença em 76%, redução

superior ao tratamento com Thiram, 65%. No campo, os tratamentos de sementes com *C. rosea* ou com Thiram foram eficientes no controle e não diferiram entre si.

Entre os mecanismos de antagonismo de *C. rosea*, a competição por espaço e nutrientes é o mais estudado, sendo considerado por alguns autores o principal mecanismo (Sutton e Peng, 1993; Morandi et al., 2001; 2003). Em morangueiro, o antagonista reduziu em torno de 98% a colonização de *Botrytis cinerea* em folhas, hastes e pétalas, e foi tão eficiente quanto aplicações de *Trichoderma viridae* ou Captan (Sutton et al., 1997). Em morangueiro, isolados brasileiros foram tão ou mais eficientes que Captan no controle de *B. cinerea*, e a aplicação duas vezes por semana foi mais eficiente que uma aplicação semanal de fungicida (Cota et al., 2008a). Em roseiras, o fungo suprimiu em torno de 99% da esporulação de *B. cinerea* (Cota et al., 2008b; Morandi et al., 2001). O fungo estabeleceu-se em tecidos de roseira e reduziu a esporulação do patógeno. Associada a medidas culturais, a aplicação contínua do antagonista pode reduzir a produção de inóculo e a incidência do mofo cinzento em botões de rosa (Morandi et al., 2003). Sob microscópio eletrônico de varredura, observou-se que hifas do antagonista penetravam em hifas e conídios de *B. cinerea* e os estrangulavam (Morandi et al., 2001), bem como promoveram a ruptura e degradação das células do patógeno (Li et al., 2002).

Há relatos de *C. rosea* também parasitando escleródios de fungos de diversas espécies (Stewart e Harrison, 1988; Keinath et al., 1991; Sutton e Peng, 1993), inclusive *S. sclerotiorum* (Rabeendran, et al., 2005; Huang e Erickson, 2008; Ondřej et al., 2010). O antagonista reduz a viabilidade dos escleródios, e evita ciclos posteriores da doença, pela redução de inóculo no campo (Huang e Erickson, 2008). Dentre 20 espécies fúngicas, *C. rosea* e *T. harzianum* isolados de escleródios de *Claviceps purpurea*, tiveram alta atividade micoparasitária de escleródios do patógeno e de *S. sclerotiorum* (Ondřej et al., 2010). Em experimento com alface em campo, a aplicação da suspensão de esporos de isolados de *Trichoderma hamatum*, *T. virens*, *T. rossicum*, *Coniothyrium minitans* e *C. rosea*, antagonistas a *S. sclerotiorum*, resultou na redução da doença causada por *S. minor*, entre 29 e 91% para isolados de *C. minitans* e *T. hamatum* (Rabeendran et al., 2005).

Isolados brasileiros de *C. rosea* reduziram a germinação miceliogênica de *S. sclerotiorum* em solo autoclavado, em diferentes níveis de temperatura, umidade e de concentração do antagonista, mas não foram eficientes em solos em condições naturais e pasteurizados (Chaves, 2011). Para o autor, a falta de fonte exógena de nutrientes que

propiciasse o estabelecimento inicial do fungo foi a principal causa para a ineficiência de *C. rosea* em condições naturais de solo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

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

Usou-se um isolado de *S. sclerotiorum* originado de plantio de soja da região de Miranda – MS, do qual semearam-se escleródios em meio BDA em placas de Petri, mantendo-as em incubadora a $21 \pm 2^\circ\text{C}$, 12h de fotoperíodo. Após 6 dias transferiram-se dois discos de micélio para 100g de cenoura picada, autoclavada em Erlenmeyers de 250mL, mantendo-se a $21 \pm 2^\circ\text{C}$ (Costa e Costa, 2006; Zazzerini e Tosi, 1986). Após 20-25 dias, os escleródios produzidos foram lavados com água estéril, secos sob câmara de fluxo e armazenados em câmara fria a $5 \pm 2^\circ\text{C}$, até o uso. Para os experimentos de sobrevivência dependendo do tratamento os escleródios foram mantidos à temperatura de laboratório.

Clonostachys rosea, isolado de escleródios de *S. sclerotiorum*, foi produzido em BDA, em placas de Petri, a 25°C , 12h de fotoperíodo. Adicionou-se suspensão de 10^5 conídios.mL⁻¹ a grãos de arroz autoclavados em sacos de polipropileno com filtro (100g de arroz por saco). Após a adição, os sacos permaneceram sob luz fluorescente, 12h de fotoperíodo, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sendo revolvidos diariamente para dispersão do micélio. Após 15 dias, os grãos de arroz colonizados foram agitados em água destilada estéril e filtrados em camada de gaze. Ajustou-se a suspensão conidial com auxílio de hemacitômetro.

Cada experimento descrito a seguir foi executado por duas vezes no delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram analisados com o programa SAS v 9.0.

3.1. Germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* em solo e areia, na presença de *Clonostachys rosea*

Usou-se latossolo vermelho, pH 5,58 e teor de matéria orgânica de 4,14dag/Kg, cuja capacidade de campo (CC) foi calculada levando-se em consideração o valor equivalente de umidade (EU), determinado pelo Laboratório de Física do Solo, no Departamento de Solos da UFV, calculado pela equação: $CC = 0,081 + 0,888 EU$ (Ruiz

et al., 2003). O solo foi previamente passado em peneiras de 2 mm, seco a temperatura ambiente e guardado em ambiente protegido da umidade e calor até ser submetido aos tratamentos. Usou-se, também, areia lavada, seca a temperatura ambiente e passada em peneiras de 2mm. O solo e a areia foram autoclavados por duas vezes a 121°C (0,1MPa) por 40min, em dias consecutivos, efetuando-se a segunda autoclavagem um dia antes da montagem dos experimentos (Huang e Erickson, 2008).

Avaliou-se a eficiência de *C. rosea* em diminuir a germinação carpogênica no solo e em areia. Colocaram-se 70g de solo ou areia autoclavados em placas de Petri (90mm). Enterraram-se 20 escleródios/placa e aplicaram-se 7mL da suspensão do antagonista com 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 ou 10^7 conídios.mL⁻¹, ou água destilada e esterilizada (ADE). Ajustou-se a umidade para próximo da capacidade de campo. Após aplicar o antagonista, as placas permaneceram em incubadora a 20°C, 12h de fotoperíodo, durante 6 semanas. Ajustou-se semanalmente a umidade para a CC. Avaliou-se diretamente, a germinação carpogênica, contando-se o número de escleródios germinados. O experimento teve cinco repetições (uma placa de Petri com 20 escleródios = uma unidade experimental).

3.2. Sobrevivência de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*, em diferentes condições de solo, na presença de *Clonostachys rosea*

Avaliou-se a sobrevivência de escleródios acondicionados em câmara fria a 5°C e à temperatura ambiente de laboratório (Dillardet al., 1995), em três condições do solo usado em 3.1 (autoclavado, pasteurizado e natural), com aplicação de *C. rosea* ou ADE. Para a pasteurização, tratou-se o solo por 3min a 80°C, 24h antes de montar o experimento. O solo natural foi aquele mantido sem qualquer tratamento térmico, em condições de temperatura ambiente (Bennett et al., 2006).

Enterraram-se 20 escleródios em 70g de solo em placas e se adicionaram 7mL da suspensão de *C. rosea*, com 10^7 conídios.mL⁻¹ ou ADE às placas, ajustando-se a umidade para próximo da CC. As placas permaneceram em incubadoras a 20°C e 12h de fotoperíodo sob luz fluorescente, e se ajustou a umidade semanalmente (Huang e Erickson, 2008).

Realizaram-se dois experimentos, um para avaliar a germinação miceliogênica e um para a carpogênica. Para a germinação miceliogênica, após 6 semanas de incubação, os escleródios foram desenterrados, desinfestados (álcool 70% por 30seg e solução de hipoclorito de sódio 2,0% por 5min), lavados três vezes em ADE, secos ao ar sob

câmara de fluxo e plaqueados em meio semi-seletivo, a 20°C com 12h de fotoperíodo (Steadman, 1994). Para a avaliação, considerou-se viável o escleródio do qual originou-se crescimento micelial (Wu et al., 2008), e/ou aquele em que houve a mudança de coloração do meio pela mudança de pH.

Para a germinação carpogênica, placas foram mantidas por 6 semanas em incubadora a 20°C, 12h de fotoperíodo. Considerou-se como germinado o escleródio de onde originou-se pelo menos uma estipe.

Cada experimento foi realizado em esquema fatorial, com três tratamentos do solo (natural, pasteurizado e autoclavado), dois condicionamentos dos escleródios (câmara fria 5°C e temperatura ambiente 25 ±2°C), presença e ausência do antagonista e quatro repetições. (uma unidade experimental = uma placa de petri com 20 escleródios).

3.3. Colonização de folhas e flores de plantas de soja e feijão por *Clonostachys rosea*

Plantaram-se sementes de feijão ‘BRSMG Madrepérola’ tipo carioca, e de soja ‘Bossier’ em substrato Tropstrato Hortaliça (HT)(Vidaderde), em potes plásticos de 2L em casa de vegetação a 25 ±3°C. Para manter o vigor vegetativo e nutricional, sempre que necessário adubaram-se as plantas com adubo NPK 20-20-20 (Peters Professional®).

Pulverizaram-se suspensões de conídios de *C. rosea* em cinco concentrações: 0, 10⁴, 10⁵, 10⁶ ou 10⁷conídios.mL⁻¹, nas plantas em pleno florescimento, as quais permaneceram em câmara de crescimento por 24h, (>90% UR), fotoperíodo de 12h, a 22°C. Após 24h de cada planta, coletaram-se folhas e flores, que permaneceram 30min sob secagem. De cada planta, retiraram-se dez pétalas de flor por parcela e confeccionaram-se dez discos foliares de 1cm de diâmetro. Semearam-se os discos foliares e as pétalas em meio paraquat-cloranfenicol-agar (Peng e Sutton, 1991), em placas de Petri (90mm), incubando-se a 20°C. Após 10 dias, sob microscópio estereoscópico, estimou-se a percentagem da área dos discos e pétalas com esporulação do fungo. Usou-se a escala de notas: 0= 0, 1= 0-3, 2= >3-6, 3= >6-12, 4= >12-25, 5= >25-37, 6 = >37-50, 7 = >50% da área dos discos colonizados com *C. rosea* (Nobre et al., 2005). Os dados de cada unidade experimental foram representados pela média de esporulação nos dez discos foliares ou nas dez pétalas.

Conduziu-se um experimento por órgão e por espécie vegetal, com cinco concentrações do antagonista e três repetições (uma unidade experimental = uma planta).

3.4. Emergência de plântulas de feijão de sementes infestadas por *Sclerotinia sclerotiorum* e tratadas com *Clonostachys rosea*

Semearam-se escleródios de *S. sclerotiorum* em meio BDA. Após 5 dias de crescimento, dez sementes de feijão ‘Madrepérola’, desinfestadas em álcool 70% por 30seg e solução de hipoclorito de sódio 2,0% por 1min e lavadas três vezes em ADE, foram depositadas sobre a colônia fúngica, com o hilo em contato com o micélio, para favorecer a infecção, ou depositadas em BDA apenas, no caso da testemunha. Após 24h, retiraram-se as sementes, as quais foram imersas em suspensão de 10^7 conídios de *C. rosea*.mL⁻¹ ou em água destilada estéril. Após 30 ou 60min, sendo retiradas e plantadas em substrato Tropstrato Hortaliça (HT) (Vidaderde) em vasos de 0,5L. Avaliou-se o percentual de plântulas emergidas. O experimento foi em esquema fatorial, com duas condições de sementes (sadias e infectadas por *S. sclerotiorum*), dois tempos de imersão (30 e 60min), presença e ausência de *C. rosea* e cinco repetições (uma unidade experimental = um vaso com dez sementes).

4. RESULTADOS

Para os experimentos relacionados à germinação carpogênica (4.1) e o estabelecimento e colonização de flores e folhas de soja e feijão (4.3), ajustou-se o modelo de regressão linear que melhor representou as tendências obtidas, considerando-se a distribuição dos resíduos e os valores dos coeficientes de determinação (R^2), coeficientes de variação (CV) e os quadrados médios dos erros (QME).

4.1. Germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* em solo e areia, na presença de *Clonostachys rosea*

Pelo teste de Levene, detectou-se homogeneidade de variâncias entre as execuções para os experimentos em solo ($P=0,73$) e areia ($P=0,66$). Houve redução significativa na germinação carpogênica na areia e no solo, na presença de *C. rosea*. Em areia, a redução decresceu com o aumento da concentração de conídios do antagonista (Figura

1A). O modelo linear ajustou-se bem aos dados ($P=0,0007$; $R^2=0,96$; $CV=9,01\%$; $QME=4,45$). Em solo, a germinação foi baixa, mesmo na testemunha. Detectou-se efeito significativo do antagonista em diferentes concentrações em reduzir a germinação carpogênica (Figura 1B). Obteve-se bom ajuste do modelo quadrático ($P=0,05$; $R^2=0,95$; $CV=49,29\%$; $QME=1,93$). Para as concentrações 10^6 e 10^7 conídios.mL⁻¹ a germinação foi zero e o ponto de menor colonização foi estimado na concentração $10^{5,93}$ conídios.ml⁻¹.

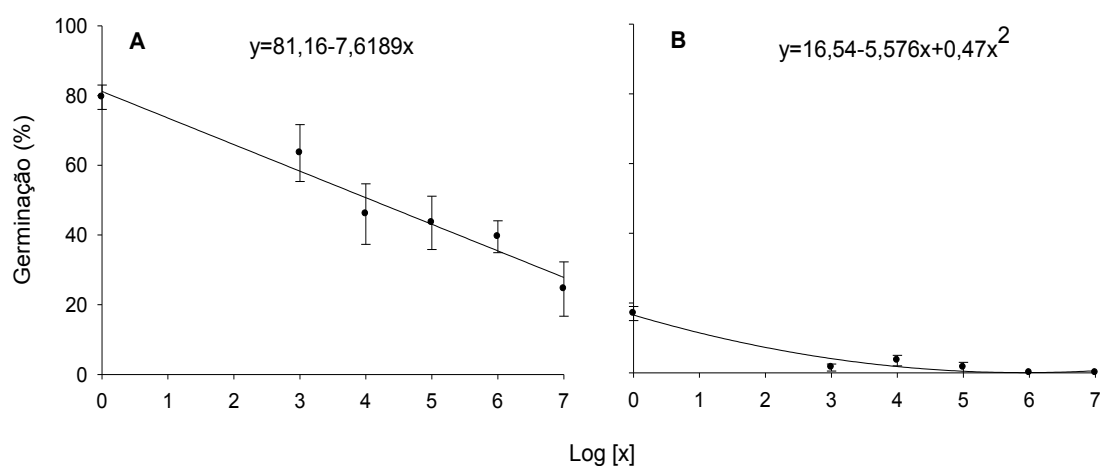


Figura 1: Germinação carpogênica (y) de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* em areia (A) e solo (B) autoclavados, com aplicação de concentrações crescentes de conídios (x) de *Clonostachys rosea*. Duas execuções, com quatro repetições por execução. As barras verticais representam o erro padrão da média.

4.2. Sobrevivência de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*, em diferentes condições de solo, na presença de *Clonostachys rosea*

Procedeu-se análise descritiva dos dados, pois não houve homogeneidade de variâncias entre as execuções. *Clonostachys rosea* não reduziu a germinação miceliogênica do patógeno em solo autoclavado, pasteurizado e natural e condições de armazenamento dos escleródios, os quais não diferiram entre si. A germinação miceliogênica foi de 100% nas duas execuções experimentais.

Como não se obteve normalidade dos dados, efetuou-se análise descritiva das médias e dos respectivos erros padrão. Considerando as tendências obtidas, *C. rosea* reduziu a germinação carpogênica do patógeno (Figura 2). A germinação dos escleródios mantidos em câmara fria foi similar à dos mantidos em condições de ambiente de laboratório. Em geral, nas duas condições de condicionamento de escleródios, na

presença de *C. rosea*, a germinação reduziu-se em mais de 50%, independentemente do tratamento do solo. A maior redução ocorreu em solo pasteurizado.

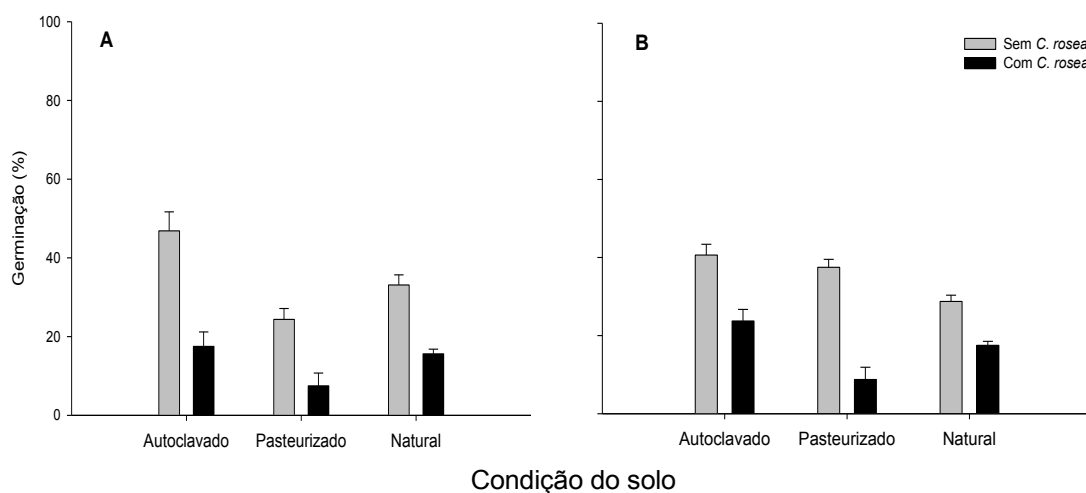


Figura 2: Germinação carpogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*, mantidos por seis semanas em solo autoclavado, pasteurizado ou natural, na presença ou ausência de *Clonostachys rosea*. A – Escleródios conservados em condições de ambiente de laboratório; B – Escleródios acondicionados em câmara fria. Duas execuções, com quatro repetições por execução. As barras verticais representam o erro padrão da média

4.3. Colonização em folhas e flores de plantas de soja e feijão por *Clonostachys rosea*

Pelo teste de Levene, observou-se homogeneidade de variância entre as execuções dos experimentos em flor ($P=0,9$) e folha ($P=0,84$) de feijoeiro e em flor ($P=0,83$) e folha ($P=0,78$) de plantas de soja.

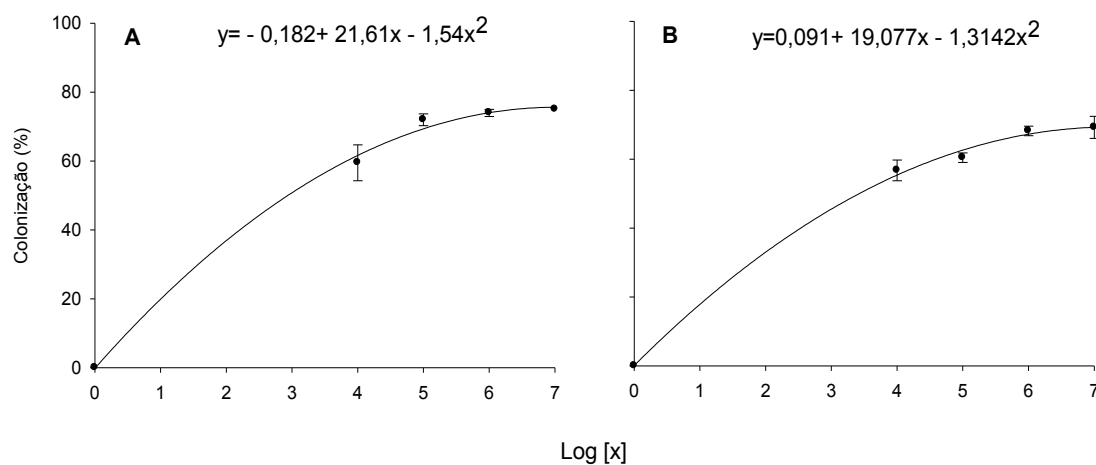


Figura 3: Colonização (y) de pétalas (A) e de discos foliares (B) por *Clonostachys rosea*, a partir de pulverização de concentrações crescentes de conídios do fungo (x) em

feijoeiro intacto. Duas execuções, com três repetições por execução. As barras verticais representam o erro padrão da média

Clonostachys rosea colonizou eficientemente os tecidos de flores e folhas do feijoeiro. O modelo quadrático foi o que melhor ajustou-se aos dados ($P=0,02$; $R^2=0,99$; $CV=4,32\%$; e $QME=2,42$ para flores e $P=0,018$; $R^2=0,99$; $CV=3,82\%$; $QME=1,95$ para folhas) (Figura 3). Estimaram-se os valores $1 \times 10^{7,02}$ e de $1 \times 10^{7,3}$ conídios.mL⁻¹ como as concentrações para obter o máximo de colonização em flores e folhas, respectivamente.

O antagonista também colonizou eficientemente os tecidos de flores e folhas de plantas de soja. Em flores, o aumento da colonização ajustou-se ao modelo linear ($P=0,002$; $R^2=0,99$; $CV=5,69\%$ e $QME=2,43$) com boa distribuição aleatória dos resíduos (Figura 4A).

Em folhas, obteve-se melhor ajuste com o modelo quadrático ($P=0,031$; $R^2=0,99$; $CV=2,31\%$ e $QME=0,99$). O ponto de colonização máxima ocorreu com $1 \times 10^{12,59}$ conídios.mL⁻¹ (Figura 4B).

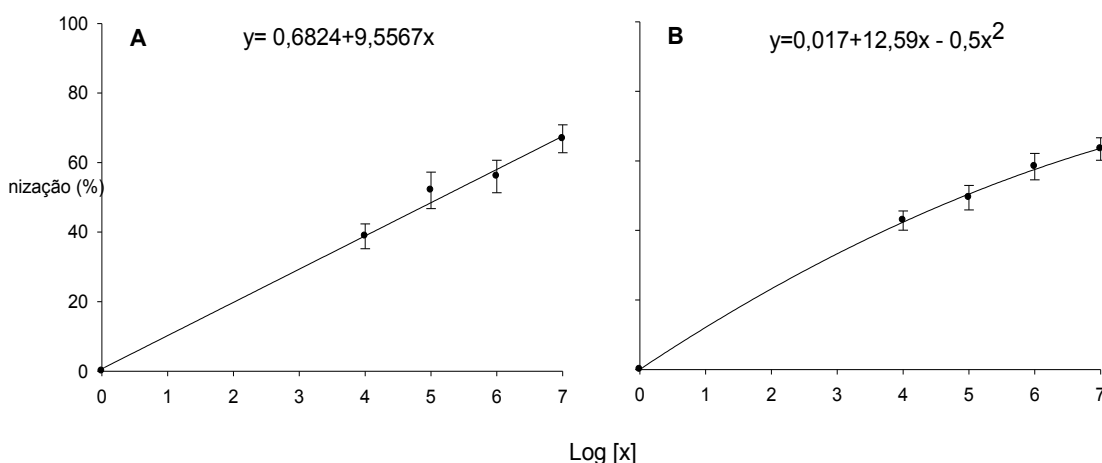


Figura 4: Colonização (y) de pétalas (A) e discos foliares (B) de soja por *Clonostachys rosea* a partir de pulverização de concentrações crescentes de conídios do fungo (x) em plantas intactas. Duas execuções, com três repetições por execução. As barras verticais representam o erro padrão da média

4.4. Emergência de plântulas de feijão de sementes infestadas por *Sclerotinia sclerotiorum* e tratadas com *Clonostachys rosea*

Observou-se, a partir de sementes infectadas tratadas com *C. rosea*, o aumento de emergência de plântulas, independente do tempo de tratamento (Figura 5). A emergência de sementes infectadas com *S. sclerotiorum* e imersas em água foi de 1% (30min de imersão) e zero (60min de imersão). Quando as sementes infectadas foram imersas em suspensão de conídios de *C. rosea*, a emergência foi de 14% (30min de

imersão) e de 37% (60min de imersão). A emergência de sementes saudas imersas na suspensão de conídios de *C. rosea* foi similar à de sementes imersas em água (maior que 60%, em todas as situações).

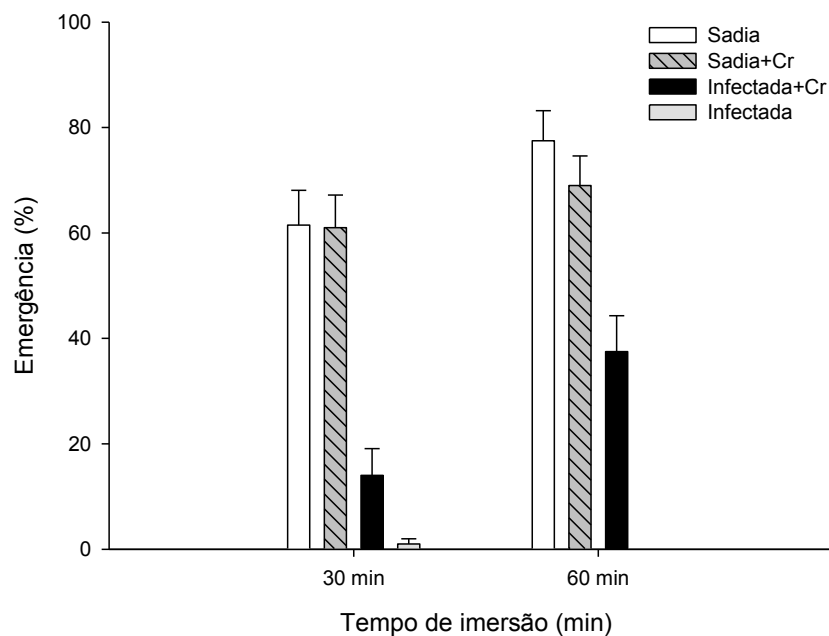


Figura 5: Emergência de feijoeiro em substrato, após imersão de sementes saudas e infectadas com *Sclerotinia sclerotiorum* em suspensão de conídios de *Clonostachys rosea* (Cr). Duas execuções, com cinco repetições por execução. As barras verticais representam o erro padrão da média

5. DISCUSSÃO

A formação dos apotécios é estágio crítico no ciclo de vida de *S. sclerotiorum*, visto a importância dos ascósporos na variabilidade do patógeno e como inóculo primário para epidemias (Casale e Hart, 1986). Assim, o controle da germinação carpogênica é de extrema importância no manejo do mofo branco, sendo válido adotar o biocontrole para reduzir a germinação. *Clonostachys rosea* pode ter potencial no manejo do mofo branco, pois reduziu a germinação carpogênica em solo e areia autoclavados.

A germinação em areia foi maior que em solo. Escleródios em areia autoclavada germinaram em maior número e com maior rapidez que escleródios mantidos em outros substratos (Reis et al., 2011). É comum ocorrer maior germinação de *S. sclerotiorum* em maior saturação de água (Mila e Yang, 2008; Nepal e Mendonça, 2012). Em areia, a energia de retenção de água é menor, resultado da menor quantidade de microporos, proporcionando maior fração de água livre disponível para germinação dos escleródios.

Houve redução na germinação carpogênica em todas as concentrações de conídios, com decréscimo linear e, na maior concentração (10^7 conídios.mL⁻¹), a redução foi superior a 50% em relação à testemunha. O antagonista cresceu pouco em areia, e se observaram pequenas colônias sobre os escleródios enterrados. Apesar do baixo crescimento, considera-se que *C. rosea* tenha potencial em reduzir a germinação carpogênica. Este efeito também ocorreu no solo, onde a germinação foi baixa (na testemunha foi de 17%), mas *C. rosea* reduziu a germinação carpogênica para zero com 10^6 e 10^7 conídios.mL⁻¹. O antagonista estabeleceu-se no solo, e na maioria das placas havia colônias grandes típicas de *C. rosea*, com abundante esporulação, mesmo nas menores concentrações, nas quais a viabilidade de escleródios reduziu-se. O uso de grãos de arroz para produção de conídios do antagonista pode ter favorecido o estabelecimento do antagonista no solo.

Observaram-se efeitos distintos de *C. rosea* quanto à germinação miceliogênica e carpogênica. Considerando-se os escleródios armazenados nos dois locais, nas três condições do solo, o antagonista não inibiu a germinação miceliogênica. Por outro lado, a germinação carpogênica, foi inibida e foi sempre menor na presença do antagonista. Sob baixas temperaturas ou flutuações da mesma, há formação de apotécios, que consomem consideráveis porções das reservas dos escleródios, levando-os a deterioração e predisposição ao ataque de outros microrganismos precocemente (Coley-Smith e Cook, 1971). Para os autores, aparentemente este efeito não ocorre na germinação miceliogênica. Portanto, considerando-se o efeito mais estressante da germinação carpogênica, é de se esperar que *C. rosea* seja mais eficiente em reduzir a germinação carpogênica. Há que se considerar, também, o tamanho dos escleródios, pois geralmente, a germinação miceliogênica, que não demanda grandes quantidades de reservas está relacionada a escleródios pequenos (Coley-Smith e Cook, 1971). Enquanto a germinação carpogênica geralmente ocorre em escleródios maiores (Hao et al., 2003; Dillard et al., 1995). Escleródios parasitados por *C. rosea*, mesmo fragmentados pelo antagonista, germinaram miceliogenicamente, mas não carpogenicamente (Chaves, 2011). O parasitismo pode influenciar as reservas do escleródio e reduzir a quantidade de carboidratos demandados na germinação carpogênica. Nos experimentos, ocorreu a germinação miceliogênica da maioria dos escleródios, mesmo superficialmente degradados e com aspecto mole, sem cobertura de melanina. O processo de germinação miceliogênica é mais simples, e a emissão de hifas a partir dos escleródios ocorreu em qualquer parte dos escleródios, fragmentados ou não. Assim, para inibir esse tipo de germinação, a eficiência de parasitismo de *C. rosea* precisaria ser maior. É também

provável que escleródios estariam mais propensos à degradação após iniciada a germinação carpogênica (Homechin, 1991). Ressalte-se que se avaliaram apenas as estipes emergidas, e o antagonista poderia ter atuado sobre os primórdios das estipes nos apotécios.

O pré-condicionamento de escleródios em baixas temperaturas é essencial para a germinação carpogênica (Huang e Erickson, 2008). Escleródios pré-condicionados a diferentes temperaturas (0-30°C), tiveram germinação carpogênica; aqueles escleródios expostos a temperaturas negativas mudaram o padrão de germinação, predominantemente carpogênica, para miceliogênica (Huang, 1991). No presente estudo, acredita-se que as condições de armazenamento dos escleródios, que estariam dentro da faixa aceitável, entre 5 e 25°C, não afetaram os dois tipos de germinação.

Não houve alteração na germinação carpogênica, nem a eficiência de *C. rosea* reduziu-se nos três tratamentos do solo. Assim, o antagonista pode parasitar os escleródios e inibir sua germinação em solos em diferentes condições, principalmente naqueles em condição natural. Na maioria dos trabalhos consultados, os antagonistas foram mais eficientes em solos autoclavados. Por exemplo, a aplicação de cinco agentes de controle biológico reduziu a germinação carpogênica, mais eficientemente em solo autoclavado do que em solo não autoclavado (Huang e Erickson, 2008). Provavelmente, resultados diferentes podem advir do uso de isolados diferentes do antagonista.

Clonostachys rosea estabeleceu-se em tecidos foliares e florais de plantas de soja e feijão. A eficiência de colonização dos diferentes tecidos foi alta mesmo em baixas concentrações. Estabelecer-se e colonizar tecidos de plantas sem causar doença, característica importante para agentes de controle biológico, comumente ocorre em isolados de *C. rosea* (Sutton et al., 1997). O isolado canadense PG-88-710 colonizou folhas e flores de roseira em diferentes estádios (Morandi et al., 2000) e isolados brasileiros colonizaram tecidos de morangueiro no campo e em casas de vegetação (Cota et al. 2008,2009). Já se relatou o antagonista colonizando raízes, hastes, vagens, folhas e sementes de diversas espécies de plantas, como soja (Schiller e Sinclair, 1984), trevo vermelho, morango e framboesa (Sutton et al., 1997), bem como associado endofiticamente a tecidos de espécies de plantas (Sutton et al., 1997; Morandi et al., 2001). Apesar de, recentemente, ter sido considerado patogênico a raízes de soja (Bienapfl et al., 2012), nos relatos anteriores em soja, nem no presente trabalho detectou-se qualquer anormalidade nas plantas que pudesse indicar ação patogênica de *C. rosea*.

Em tecidos foliares e florais de feijoeiro, obteve-se a máxima colonização com concentrações de conídios próximas à maior concentração usada. Assim, altos níveis de colonização ocorreram com concentrações facilmente obtidas em substratos comuns como arroz ou em meios de cultura como o BDA. Aparentemente, a colonização em soja foi menor que em feijoeiro, e houve maior colonização na maior concentração. A diferença entre feijoeiro e soja é esperada, pois a colonização pode variar em função do substrato de origem dos isolados, hospedeiro e da disponibilidade de nutrientes para o estabelecimento, o que define a eficiência da colonização (Nobre et al., 2003). De qualquer forma, vale frisar que a colonização ocorreu com concentrações de conídios facilmente atingíveis na multiplicação de *C. rosea*.

O sucesso no biocontrole de fitopatógenos requer estabelecimento, colonização e alta esporulação dos antagonistas nos diferentes tecidos (Nobre et al., 2003). Na maioria das epidemias do mofo branco, o campo de infecção de *S. sclerotiorum* é a flor, que senescente é fonte exógena de nutrientes para que o ascósporo inicie a infecção e colonize órgãos como folhas, caules e vagens em formação (Boland e Hall, 1988). Assim, espera-se que o isolado de *C. rosea* testado seja eficiente em evitar infecções ascospóricas e reduzir o progresso da doença em outros tecidos, considerando a eficiência da colonização floral de planta de feijão e soja. Outros antagonistas, como *Trichoderma virens*, *Talaromyces flavus*, *Trichothecium roseum*, *Coniothyrium minitans* e *Epicoccum purpurascens*, reduziram a incidência do mofo branco em lavoura de feijão, quando aplicados durante a floração (Huang et al., 2000).

Quando se aplicou *C. rosea* em sementes de feijão infectadas com o patógeno, houve aumento da emergência de plântulas. O aumento ocorreu em ambos os períodos de imersão das sementes (30 e 60min) na suspensão de conídios do antagonista. Sementes de ervilhas originadas de plantas naturalmente infectadas com patógenos associados ao complexo de podridão radicular, após tratadas com o isolado ACM941 de *C. rosea*, tiveram aumento de 44% de germinação e 22% de emergência de plântulas (Xue, 2003). O resultado aqui obtido é inédito e importante epidemiologicamente, pois *S. sclerotiorum* é transmitido pelas sementes e pode reduzir a germinação e emergência de plântulas (Tu, 1997). Considerando-se a eficiência de *C. rosea* em aumentar a emergência, o antagonista é potencialmente aplicável para manejo do mofo branco no campo. Vale destacar que a emergência de plântulas a partir de sementes não infectadas tratadas com *C. rosea* foi similar à emergência a partir de sementes não infectadas e tratadas com água. Após um mês, plantas dos dois tratamentos não diferiram quanto ao tamanho, indicando que o antagonista não interferiu no desenvolvimento de plantas

originadas de sementes saudáveis. Quando aplicado em sementes, o antagonista aumentou o crescimento de cevada e controlou *Fusarium culmorum* (Jensen et al., 2000). No presente trabalho, não se observou promoção de crescimento, nem tampouco sintomas de doença nas plantas de feijão. Demandam-se ensaios futuros para avaliar se *C. rosea* estabelece-se como endofítico e pode promover crescimento de plantas oriundas de sementes saudáveis e infectadas.

Considerando os resultados obtidos, *C. rosea* é antagonista promissor de *S. sclerotiorum* para o manejo do mofo branco, pois reduziu a germinação carpogênica no solo. O fungo colonizou tecidos foliares e florais considerados importantes para o início das infecções ascospóricas do patógeno, em soja e feijoeiro. Fato importante foi haver o aumento da germinação de sementes infectadas e tratadas com suspensão de conídios. A colonização eficiente do filoplano representa o sucesso no antagonismo, e diante dos resultados obtidos, espera-se que *C. rosea* tenha eficiência em competir com o patógeno. O potencial em interferir em mais de um dos componentes do ciclo de vida do patógeno aumenta as chances de sucesso no biocontrole e ajuda a traçar estratégias no manejo do mofo branco. Há necessidade de novos ensaios para melhor avaliar a eficiência do antagonista em reduzir a germinação miceliogênica, bem como para testar em plantas de soja e feijão, o efeito de aplicações em reduzir a infecção ascospórica do patógeno em flores e folhas. Vale destacar que os resultados encontrados são inovadores, principalmente considerando-se as perdas que o mofo branco causa nas duas culturas e a baixa eficiência das atuais medidas de controle da doença.

6. CONCLUSÕES

Clonostachys rosea reduziu a viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum*, principalmente em relação à germinação carpogênica, em solo e areia, autoclavados ou não.

O antagonista foi eficiente em colonizar pétalas e folhas de soja e feijoeiro, tecidos importantes nas infecções do patógeno.

O tratamento de sementes infectadas por *S. sclerotiorum* aumentou a emergência de plântulas de feijão.

Clonostachys rosea é potencialmente viável no manejo do mofo branco em culturas de soja e feijoeiro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abawi, G. S., Grogan, R. G. 1975. Source of primary inoculum and effects of temperature and moisture on infection of beans by *Whetzelinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 65:300-309.
- Adams, P.B., Ayers, W. A. 1979. Ecology of *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69:896-899.
- Baker, K. F., Cook, R. J. 1974. Biological control of pathogens. San Francisco: W.H. Freeman and Company, 433p.
- Bardin, S. D., Huang, H. C. 2001. Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23:88-98.
- Bennett, A. J., Leifert, C., Whipps, J. M. 2006. Survival of the biocontrol agents *Coniothyrium minitans* and *Bacillus subtilis* MBI 600 introduced into pasteurized, sterilized and non-sterile soils. *Soil Biology and Biochemistry* 35:1565-1573.
- Bettiol, W., Morandi, M. A. B., Pinto, Z. V., Paula Junior, T. J., Correa, E. B., Moura, A. B., Lucon, C. M. M., Costa, J. C., Bezerra, J. L. 2009. Bioprotetores comerciais para doenças de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 17:27-47.
- Bienapfl, J. C., Floyd, C. M., Percich, J. A., Malvick, D. K. 2012. First report of *Clonostachys rosea* causing root rot of soybean in the United States. *Plant Disease* 96:1700 (Note).
- Boland, G. J. e Hall, R. 1988. Epidemiology of *Sclerotinia* stem rot of soybean in Ontario. *Phytopathology* 78:1241-1245.
- Boland, G. J., e Hall, R. 1988. Relationships between the spatial pattern and number of apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* and stem rot of soybean. *Plant Pathology* 37:329-336.
- Bolland, G. J., Hall, R. 1994. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 16:93-108.
- Bolton, M.D., Thomma, B.P.H.J., Nelson, B.D. 2006. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular plant pathology* 7:1-16.
- Caesar, A. J. e Pearson, R. C. 1983. Environmental factors affecting survival of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 73:1024-1030.
- Casale, W. L., Hart, L. P. 1986. Influence of four herbicides on carpogenic germination and apothecium development of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 76:980-984
- Chaves, E. 2011. Sobrevivência de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* em solo, com aplicação de *Clonostachys rosea*. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil. 47p.
- Chaves, G. M. 1964. Estudos sobre *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib. de Bary). *Experientiae* 4:69-133.

- Chet, I. 1987. *Trichoderma* - application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. 137-160 in: Chet, I (ed.), Innovative Approaches to Plant Disease Control. John Wiley e Sons: New York. 372p.
- Chet, I., Inbar, J. 1994. Biological control of fungal pathogens. Applied Biochemistry and Biotechnology 48:37-43.
- Clarkson, J. P., Phelps, K., Whipps, J. M., Young, C. S., Smith, J. A. Watling, M. 2004. Forecasting *Sclerotinia* disease on lettuce: Toward developing a prediction model for carpogenic germination of sclerotia. Phytopathology 94:268-279.
- Cline, M. N., Jacobsen, B. J. 1983. Methods for evaluating soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Disease 67:784-786.
- Coley-Smith, J. R., Cooke, R.C. 1971. Survival and germination of fungal sclerotia. Annual Review of Phytopathology 9:65-92
- Cook, G. E., Steadman, J. R., Boosalis, M. G. 1975. Survival of *Whetzelinia sclerotiorum* and initial infection of dry edible beans in western Nebraska. Phytopathology 65:250-255.
- Correa, E. B., Bettiol, W., Morandi, M. A. B. 2010. Biological control of *Pythium aphanidermatum* root rot and growth promotion of hydroponic lettuce by *Clonostachys rosea*. Tropical Plant Pathology 35:248-252.
- Costa, G. R., Costa, J. L. D. S. 2006. Influência do solo e de substratos para produção de escleródios na germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum*. Pesquisa Agropecuária Tropical 36:83-87.
- Cota, L. V., Maffia, L. A., Mizubuti, E. S. G. 2008a. Brazilian isolates of *Clonostachys rosea*: colonization under different temperature and moisture conditions and temporal dynamics on strawberry leaves. Letters in Applied Microbiology 46:312-317.
- Cota, L. V., Maffia, L. A., Mizubuti, E. S. G., Macedo, P. E. F., Antunes, R. F. 2008b. Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. Biological Control 46:515-522.
- Danielson, R. M., Davey, C. B. 1973. The abundance of *Trichoderma* propagules and the distribution of species in forest soils. Soil Biology and Biochemistry 5:485-94.
- Davet, P. 1979. Activité antagoniste et sensibilité aux pesticides de quelques champignons associés aux sclerotes du *Sclerotinia minor* Jagger. Annals of Phytopathology 11:53-60.
- Dhingra, O. D., Mendonça, H. L., Macedo, D. M. 2009. Doenças e seu controle. 133-155 in: Sediyaama, T.(ed.). Tecnologias de produção e usos da soja. Londrina, Mecenas. 314p.
- Dillard, H. R., Ludwig, J. W., Hunter, J. E. 1995. Conditioning sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* for carpogenic germination. Plant Disease 79:411-415
- Elad, Y., Chet, I., Boyle, P., Hennis, Y. 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* on electron microscopy and fluorescence microscopy. Phytopathology 73:85.

- Elad, Y., Chet, I., Hennis, Y. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. Canadian Journal of Microbiology 28:719-725.
- Ferguson, L. M., Shew, B. B. 2001. Wheat straw mulch and its impacts on three soilborne pathogens of peanut in microplots. Plant Disease 85:661-667.
- Fernando, W. G. D., Nakkeerran, S., Zhang, Y., Savchuk, S. 2005. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals. Crop Protection 26:100-107.
- Ferraz, L. C. L. Ocorrência e medidas de manejo de *Sclerotinia sclerotiorum* em hortaliças no Brasil, Palestras. In: Encontro Internacional de mofo branco, 2012, Ponta Grossa, PR. Anais. Ponta Grossa: UEPG. 82p.
- Ferraz, L. C. L., Café, A. C., Nasser, L. C. B., Azevedo, J. 1999. Effects of soil moisture, organic matter and grass mulching on the carpogenic germination of sclerotia and infection of bean by *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Pathology 48:77-82.
- Foster, A. J., Kora, C., McDonald, M. R., and Boland, G. J. 2011. Development and validation of a disease forecast model for *Sclerotinia* rot of carrot. Canadian Journal of Plant Pathology 33:187-201.
- Fravel, D. R. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. Annual Review of Phytopathology 43:337-359.
- Gao X, Han Q, Chen Y, Qin H, Huang L, Kang Z. 2013. Biological control of oilseed rape *Sclerotinia* stem rot by *Bacillus subtilis* strain Em7. Biocontrol Science and Technology 24:39-52
- Garcia, R. A. 2008. Produção de inóculo, efeito de extratos vegetais e de fungicidas e reação de genótipos e soja à *Sclerotinia sclerotiorum*. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. 154p.
- Görge, C. A. 2009. Manejo do mofo branco da soja com palhada de *Brachiaria ruziziensis* e *Trichoderma harzianum* '1306'. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Goiás, Campus Jataí. Jataí – Goiás – Brasil. 72p.
- Gossen, B.D., Rimmer, S.R. e Holley, J.D. 2001. First report of resistance to benomyl fungicide in *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Disease 85:1206 (Note).
- Gracia-Garza, J. A., Neumann, S., Vyn, T. J., Boland, G. J. 2002. Influence of crop rotation and tillage on production of apothecia by *Sclerotinia sclerotiorum*. Canadian Journal of Plant Pathology 24:137-143.
- Grau, C. R., e G.L. Hartman. 1999. *Sclerotinia* stem rot. 33-35 in: G.L. Hartman, J.B. Sinclair, and J.C. Rupe (ed). Compendium of soybean diseases. 4th ed. American Phytopathological Society. 100p.
- Hadar, Y., Chet, I., Hennis, Y. 1979. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 69:64.
- Handelsman, J., Stabb, E. V. 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. The Plant Cell 8:1855-1869.

- Hannusch, D.J., e Boland, G. J. 1996. Influence of air temperature and relative humidity on biological control of white mold of bean (*Sclerotinia sclerotiorum*). *Phytopathology* 86:156-162.
- Hao, J. J., Subbarao, K. V., Duniway, J. M. 2003. Germination of *Sclerotinia minor* and *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia under various soil moisture and temperature combinations. *Phytopathology* 93:443-450.
- Harman, G. E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2:43-56.
- Homechin, M. 1991. Controle biológico de patógenos do solo. 7-23 in: Bettiol, W., ed. *Controle biológico de doença de plantas*. Jaguariúna: Embrapa-CNPDA.
- Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87:4-10.
- Huang, H. C. 1978. *Gliocladium catenulatum*: Hyperparasite of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium* species. *Canadian Journal of Botany* 56: 2243-2246.
- Huang, H. C. Kozub, G. C. 1991. Temperature requirements for carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates of different geographic origin. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 32:279-286.
- Huang, H. C., Bremer, E., Hynes, R. K., Erickson, R. S. 2000. Foliar application of fungal biocontrol agents for the control of white mold of dry bean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological Control* 18:270-276
- Huang, H.C., Erickson, R. S. 2008. Factors affecting biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* by fungal antagonists. *Journal of Phytopathology* 156:628-634
- Illipronti, J. R., Machado, J. C. 1993. Antagonismo de fungos a *Sclerotinia sclerotiorum* em soja e feijão. *Fitopatologia Brasileira* 18:162-166.
- Jensen, B., Knudsen, I. M. B., Jensen, D. F. 2000. Biological seed treatment of cereals with fresh and long-term stored formulations of *Clonostachys rosea*: Biocontrol efficacy against *Fusarium culmorum*. *European Journal of Plant Pathology* 106: 233–242.
- Kapil, R., Kapoor, A. S. 2005. Management of white rot pea incited by *Sclerotinia sclerotiorum* using *Trichoderma* spp. and biopesticides. *Indian Phytopathology*. 58:10-16.
- Keinath, A. P., Fravel, D. R., Papavizas, G. C. 1991. Potential of *Gliocladium roseum* for biocontrol of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 81:644-648.
- Krauss, U., Soberanis, W. 2001. Biocontrol of cocoa pod diseases with mycoparasite mixtures. *Biological Control* 22:149–158.
- Kurle, J.E., Grau, C.R., Oplinger, E.S. Mengistu, A. 2001. Tillage, crop sequence, and cultivar on *Sclerotinia* stem rot incidence and yield in soybean. *Agronomy Journal* 93:973-982.

- Lahoz, E., Contillo, R., Porrone, F. 2004. Induction of systemic resistance to *Erysiphe orontii* cast in tobacco by application on roots of an isolate of *Gliocladium roseum* Bainier. *Journal of Phytopathology* 152:465-470.
- Li, 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.
- Lobo Junior, M., Geraldine, A. M., Carvalho, D. D. C. Cobucci, T. 2009. Uso de cultivares de feijão comum com arquitetura ereta e ciclo precoce para escape do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*). Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão. 4p.
- Louzada, G. A. D. S., Carvalho, D. D. C., Mello, S.C.M., Júnior, M.L., Martins, I., Braúna, L.M. 2009. Potencial antagonístico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. *Biota Neotropica* 9:145-149.
- Mamarabadi, M., Jensen, D. F., Lubeck, M. 2009. An N-acetyl-b-D-glucosaminidase gene, cr-nag1, from the biocontrol agent *Clonostachys rosea* is up-regulated in antagonistic interactions with *Fusarium culmorum*. *Mycological Research* 113:33-43.
- Markell, S., Malvick, D., Nelson, B. 2010. Disease management and identification. 93-123 in: Kandel, H. (ed.). *Soybean production: field guide for North Dakota and Northwestern Minnesota*. Minnesota, NDSU Extension Agronomist. 174p. Disponível em: <http://www.ag.ndsu.edu/pubs/plantsci/rowcrops/a1172.pdf>. Acessado em: 20 de setembro de 2013.
- Mila, A. L., Yang, X. B. 2008. Effects of fluctuating soil temperature and water potential on sclerotia germination and apothecial production of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease* 92:78-82
- Morandi, M. A. B., Maffia, L. A., Mizubuti, E. S. G., Alfenas, A. C., Barbosa, J. G. 2003. Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: a valuable component in Botrytis blight management in commercial greenhouses. *Biological Control* 26:311–317.
- Morandi, M. A. B., Maffia, L. A., Sutton, J. C. 2001. Development of *Clonostachys rosea* and interactions with *Botrytis cinerea* in rose leaves and residues. *Phytoparasitica* 29:1-11.
- Morandi, M. A. B., Mattos, L. P. V., Santos, E. R., Bonugli, R. C. 2008. Influence of application time on the establishment, survival, and ability of *Clonostachys rosea* to suppress *Botrytis cinerea* sporulation on rose debris. *Crop Protection* 27:77-83.
- Morandi, 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
- Morandi, M.A.B., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G., Alfenas, A.C., Barbosa, J.G., Cruz, C.D. 2006. Relationships of microclimatic variables to colonization of rose debris by *Botrytis cinerea* and the biocontrol agent *Clonostachys rosea*. *Biocontrol Science and Technology* 16:619-630.
- Mueller, D. S., Dorrance, A. E., Derksen, R. C., Ozkan, E., Kurle, J. E., Grau, C. R., Gasta, J. M., Hartman, G. L., Bradley, C. A., Pedersen, W. L. 2002. Efficacy of

- fungicidas on *Sclerotinia sclerotiorum* and their potencial for control of Sclerotinia stem rot on soybean. *Plant Disease* 86:26-31.
- Napoleão, R., Café Filho, A. C., Nasser, L. C. B., Lopes, C. A., Silva, H. R. 2005. Intensidade do mofo-branco do feijoeiro em plantio convencional e direto sob diferentes lâminas de água. *Fitopatologia Brasileira* 30:374-379.
- Nepal, A., Mendoza, L. E. D. 2012. Effect of sclerotial water content on carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease* 96:1315-1322
- Newton, H. C. Siqueira, L. 1972. Ascospores as the primary infective propagule of *Sclerotinia sclerotiorum* in Wisconsin. *Plant Disease Reporter* 56:798-802.
- 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.
- Ojaghian, M. R. 2011. Potential of *Trichoderma spp.* and *Talaromyces flavus* for biological control of potato stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytoparasitica* 39:185-193.
- Ondrej, M., Cagas, B., Ondrácková, E. 2001. Effect of the mycoflora of ergot (*Claviceps purpurea*) sclerotia on their viability. *Plant Protection Science* 46:66-71.
- Ozbay, N., Newman, S. 2004. Biological control with *Trichoderma* spp. with emphasis on *T. harzianum*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7:478-484.
- Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 23:23-54.
- Park, Y. H., Stack, J. P., Kenerly, C. M. 1992. Seletive isolation and enumeration of *Gliocladium virens* and *G. roseum* from soil. *Plant Disease* 76:230-235.
- Parkinson, D., Taylor, G. S., Pearson, R. 1963. Studies on fungi in the root region. VI. The development of fungi on young roots. *Plant and Soil* 19:322-49.
- Paula Junior, T. J., Vieira, R. F., Rocha, P. R. R., Bernardes, A., Costa, E. L., Carneiro, J. E. S., Vale, F. X. R., Zambolim, L. 2009. White mold intensity on common bean in response to plant density, irrigation frequency, grass mulching, *Trichoderma* spp., and fungicide. *Summa Phytopathologica* 35:44-48.
- Peng, G., Sutton, J. C. 1991. Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. *Canadian Journal of Plant Pathology* 13:247-257.
- Purdy, L. H. 1979. *Sclerotinia sclerotiorum*: History, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. *Phytopathology* 69:875-880.
- Rabeendran, N., Jones, E. E., Moot, D. J., Stewart, A. 2005. Biocontrol of *Sclerotinia* lettuce drop by *Coniothyrium minutans* and *Trichoderma hamatum*. *Biological Control* 39:352-362.
- Reis, E. M., Casa, R. T., Moreira, E. N., Gava, F., Sachs, C. 2011. Indução da germinação carpogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* sob diferentes substratos. *Revista de Ciências Agroveterinárias* 10:145-150.

- Roberti, R., Veronesi, A., Cesari, A., Cascone, A., Di Berardino, I., Bertini, L., Caruso, C. 2008. Induction of PR proteins and resistance by the biocontrol agent *Clonostachys rosea* in wheat plants infected with *Fusarium culmorum*. *Plant Science* 175:339-347.
- Rodríguez M.A., Cabrera G., Gozzo, F. C., Eberlin, M.N., Godeas, A. 2011. *Clonostachys rosea* BAF3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. *Journal of Applied Microbiology* 110:1177–1186.
- Roiger, D. J., Jeffers, S. N., Caldwell, R. W. 1991. Occurrence of *Trichoderma* species in apple orchard and woodland soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 23:353-359.
- Rousseau, G., Rioux, S., Dostaler, D. 2007. Effect of crop rotation and soil amendments on *Sclerotinia* stem rot on soybean in two soils. *Canadian Journal of Plant Science* 87:605-614.
- Santos, A. F., Dhingra, O. D. 1982. Pathogenicity of *Trichoderma* spp. on the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Botany* 60:472-475.
- Schiller, C. T., Sinclair, J.B. 1984. Microorganisms associated with soybean vascular exudate and plant parts. *International Journal of Tropical Plant Diseases* 2:1-4.
- Schroers, H. J., Samuels, G. J., Seifert, K.A., 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.
- Schwartz, H. F., Steadman, J. R. 1978. Factors affecting sclerotium populations of and apothecium production by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 68:383-388.
- Schwartz, H. F., Steadman, J. R. 1989. White mold. 211-230 in: Schwartz, H. F., Pastor-Corrales (eds.). *Bean production problems in the tropics*. 2.ed. Cali, Colombia: CIAT. 726p.
- Shoresh, M., Harman, G. E., Mastouri, F. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology* 48:21-43.
- 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.
- Steadman, J. R. 1983. White mold – A serious yield-limiting disease of bean. *Plant Disease* 67:346-350.
- Steadman, J. R., Marcinkowska, J., Rutledge, S. 1994. A semi-selective medium for isolation of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Ottawa 16:68-70.
- Stewart, A., Harrison, Y. A. 1988. Mycoparasitism of sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. *Australasian Plant Pathology* 18:10-14.
- Sutton, J. C. 1995. Evaluation of micro-organisms for biocontrol: *Botrytis cinerea* and strawberry, a case study. *Advances in Plant Pathology* 2:173-190.

- Sutton, J. C., Li, D. W., Peng, G., Yu, H., Zhang, P. G., ValdebenitoSanhueza, R. M. 1997. *Gliocladium roseum* - A versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. Plant Disease, 81:316-328
- Sutton, J. C., Peng, G. 1993. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. Phytopathology 83:615-621.
- Trutmann, P. e Keane, P. J. 1990. *Trichoderma koningii* as a biocontrol agent for *Sclerotinia sclerotiorum* in Southern Australia. Soil Biology and Biochemistry 22:43-50.
- Tu, J.C. 1989. Management of white mold of white beans in Ontario. Plant Disease 73:281-285.
- Tu, J.C. 1997. An integrated control of white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) of beans, with emphasis on recent advances in biological control. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 38:73-76.
- United States Department of Agriculture. National *Sclerotinia* Initiative. 2013. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/Research/docs.htm?docid=20317epage=2#Introduction>>. Acessado em: 15 Abril de 2013.
- Vuong, T. D., Diers, B. W., Hartman, G. L. 2008. Identification of QTL for resistance to *Sclerotinia* stem rot in soybean plant introduction 194639. Crop Science 48:2209-214.
- Wells, H. D., Bell, D. K., Jaworski, C. A. 1972. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology 62:442-47.
- Whipps, J. M. Budge, S. P. 1990. Screening for sclerotia mycoparasites of *Sclerotinia sclerotiorum*. Mycological Research 94:607-612.
- Whipps, J.M. Microbial interactions and biocontrol in rhizosphere. 2000. Journal of Experimental Botany 52:487-511.
- Willems, H. J. e Wong, J. A. 1980. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. Botanical Review 46:101-165.
- Wu, B. M., Subbarao, K. V., Liu, Y. B. 2008. Comparative survival of sclerotia of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum*. Phytopathology 98:659-665.
- Xue, A. G. 2003. Biological control of pathogens causing root rot complex in field pea using *Clonostachys rosea* strain ACM941. Phytopathology 93:329-335.
- Zizzerini, A., Tossi, L. 1985. Antagonistic activity of fungi isolated from sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Pathology 34:415-421.