



**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Botrytis cinerea* IN VITRO E EM MUDAS DE *Eucalyptus* sp.**

**ELOÍSA APARECIDA DAS GRAÇAS LEITE LOPES**

**2001**

52412  
MFN: 37113

ELOÍSA APARECIDA DAS GRAÇAS LEITE LOPES

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Botrytis cinerea* IN VITRO E EM  
MUDAS DE *Eucalyptus* sp.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

PROF. DR. HILÁRIO ANTÔNIO DE CASTRO

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

2001

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Lopes, Eloísa Aparecida das Graças Leite

Controle biológico de *Botrytis cinerea* *In Vitro* e em mudas de *Eucalyptus* sp.

/Eloísa Aparecida das Graças Leite Lopes. -- Lavras : UFLA, 2001.

45 p. : il.

Orientador: Hilário Antônio de Castro.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Controle biológico 2. *Botrytis cinerea*. 3. *Eucalyptus* sp. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-632.96

-634.97342

REGISTRADO

51.80.10

**ELOÍSA APARECIDA DAS GRAÇAS LEITE LOPES**

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Botrytis cinerea* IN VITRO E EM MUDAS  
DE *Eucalyptus* sp.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de "Mestre".

**APROVADA em 3 de agosto de 2001**

**Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza**

**UFLA**

**Prof. Dr. Antônio Cláudio Davide**

**UFLA**

**Pesq. Dra. Sara Maria Chalfoun**

**EPAMIG**



**Prof. Dr. Hilário Antônio de Castro**  
**Departamento de Fitopatologia/UFLA**  
**(Orientador)**

**LAVRAS**  
**MINAS GERAIS - BRASIL**

**Em memória de minha mãe, Hilda de Oliveira Leite ,**

**Ao meu irmão, João Batista de Oliveira ,**

**Ao meu sobrinho, João Batista de Oliveira Junior,**

**OFEREÇO**

**Ao meu pai Sebastião de Oliveira Leite;**

**Ao meu esposo, Benedito Donizeti Alcaraz Lopes;**

**À minha irmã, Maria Silvia de Oliveira;**

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder paciência, sabedoria, saúde e apoio em todos os momentos difíceis durante a realização do curso.

À Universidade Federal de Lavras, UFLA, em especial ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização deste curso.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental – CNPMA, pela oportunidade e apoio concedidos para meu aperfeiçoamento profissional.

Ao meu esposo, Benedito Donizeti Alcaraz Lopes, por todos os momentos juntos, pelo seu apoio, auxílio, compreensão, amor e pelos momentos felizes.

À minha irmã, Maria Silvia de Oliveira, por todos os momentos juntos, pelo seu apoio e por todos os pensamentos positivos.

Ao Prof. Dr. Wagner Bettiol, Pesquisador da Embrapa-CNPMA, pela orientação e ensinamentos recebidos.

Ao Prof. Dr. Hilário Antônio de Castro pela orientação, amizade e apoio prestados no decorrer deste trabalho.

Aos membros da banca, Sára Maria Chalfoun, Edson Ampélio Pozza e Antônio Cláudio Davide, pelas valiosas sugestões e contribuições para o enriquecimento deste trabalho.

Aos Meus colegas e amigos, Eduardo Alves e Eliana Aparecida Mesquita Alves, pela amizade, paciência, colaboração em transmitir seus conhecimentos e apoio prestados durante a execução deste trabalho.

Aos Professores Mário Sobral de Abreu, Ricardo Magela de Souza, Mário Lúcio Vilela de Resende, Ludwig Heinrich Pfenning e Vicente Paulo Campos pelo empenho em transmitir seus conhecimentos, contribuindo sobremaneira com o meu aperfeiçoamento profissional e pela amizade.

Ao professor Ronald Zanetti Bonetti Filho pelo incentivo e apoio concedidos para meu aperfeiçoamento profissional.

Ao Heltom Alexandre Custódio Lopes pelo apoio e pela amizade

Ao meu amigo e colega Ricardo Tadeu Pereira pelo apoio, pela dedicada colaboração técnica na execução dos trabalhos e inestimável amizade, e por sempre estar presente.

Aos técnicos do laboratório de Fitopatologia da Embrapa – Meio Ambiente, Mara Denise Luck Mendes, Rosângela, Carla e Gilberto Rodrigues da Silva, pela colaboração e inestimável amizade.

Aos meus colegas e técnicos do laboratório de Fitopatologia da UFLA, Marcos, Ana Maria e Carlos, que contribuíram direta e/ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À minha colega e amiga Nazaré de Moura Vitorino pela ajuda e amizade prestadas.

À secretária Maria de Lourdes Oliveira Silva pelo incentivo e amizade prestadas.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação pelo espírito de equipe, de força de vontade e amizade que, sem dúvida, estimularam-me a superar as dificuldades deste caminho.

Muito Obrigada!

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO .....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO .....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	03
2.1 Taxonomia de <i>Botrytis cinerea</i> .....	03
2.2 Ciclo das doenças causadas por <i>Botrytis</i> sp. ....	03
2.3 Controle Biológico de fito doenças .....	05
2.3.1 Mecanismo das interações antagonistas.....	06
2.3.2 Microrganismos antagônicos .....	07
2.3.2.1 <i>Trichoderma</i> sp. e <i>Gliocladium roseum</i> .....	07
2.3.2.2 <i>Bacillus</i> spp. e seus metabólitos .....	11
2.3.2.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	11
2.4 Controle Químico.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	16
3.1 Isolamento dos fungos antagonistas localizados no solo e substrato usado nos tubetes .....	16
3.2 Isolamento de <i>B. cinerea</i> e antagonistas a partir de estacas, micro estacas e plantas jovens de <i>Eucalyptus grandis</i> .....	17
3.3 Seleção inicial e identificação dos possíveis antagonistas .....	18
3.4 Preparo da suspensão de células de <i>Bacillus subtilis</i> ; seus metabólitos (Subtin) e células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	18
3.5 Cultivo e preparo do inóculo de <i>Clonostachys rosea</i> B-27 e <i>Trichoderma</i> sp. H-18 .....	20
3.6 Cultivo e preparo do inóculo de <i>Botrytis cinerea</i> .....	20
3.7 Fungicida.....	21



3.8 Efetividade dos antagonistas na supressão de <i>B. cinerea</i> em discos de folhas de <i>Eucalyptus grandis in vitro</i> .....	21
3.9 Avaliação dos resultados .....	22
3.10 Época de aplicação dos tratamentos antagonistas .....	23
3.11 Efetividade dos isolados fúngicos para supressão de <i>B. cinerea</i> em mudas de <i>Eucalyptus citriodora</i> .....	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	26
5 CONCLUSÕES .....	35
6 REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

## RESUMO

LOPES, Eloisa Aparecida das Graças Leite. Controle Biológico de *Botrytis cinerea* In Vitro E Em Mudas de *Eucalyptus* sp. 2001. 43p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG\*

As empresas florestais mesmo com a alta tecnologia desenvolvida nos últimos anos ainda encontram sérias dificuldades para controlar as doenças de etiologia fúngica. Dentre as muitas doenças fúngicas que ocorrem em viveiros florestais de eucalipto, destacam-se o mofo cinzento e o tombamento de mudas, causados por *Botrytis cinerea* Pers. & Fries.. O ambiente com elevada umidade e temperatura entre 20 a 24 é extremamente favorável para o patógeno, pois nessas condições o mesmo é favorecido em termos de sobrevivência, de adaptação, de disseminação e de infecção. A utilização intensa de pesticidas para o controle de fitodoenças e pragas em culturas de interesse agrícola e sua conseqüência para o ecossistema, tem induzido os pesquisadores a buscar métodos alternativos de controle. Neste contexto, o controle biológico teve grandes avanços, obtendo resultados promissores. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o controle biológico de *Botrytis cinerea* empregando *Bacillus subtilis*, Subtin, *Clonostachys rosea*, *Trichoderma* sp.e *Saccharomyces cerevisiae*. Foram realizados 3 experimentos no laboratório e câmara de nebulização do Departamento de Fitopatologia da UFLA. O delineamento experimental dos dois primeiros ensaios foi inteiramente casualizado, com dois fatores e quatro repetições. O fator um foi constituído por 7 níveis, correspondendo aos tratamentos com controle biológico I-Testemunha, II-Tolyfluanid (fungicida), III-*Bacillus subtilis*, IV-Subtin, V- *Clonostachys rosea*, VI-*Trichoderma* sp. VII- *Saccharomyces cerevisiae*; o fator 2 correspondeu aos períodos de aplicação do patógeno. No primeiro experimento, foram realizadas aplicações dos tratamentos e inoculação do patógeno *B. cinerea* 24h antes, 24h depois e simultaneamente ao tratamento. No segundo experimento, foram realizados os tratamentos biológicos 24h antes, 48h antes e 72 h antes da inoculação do patógeno. Após o período de incubação de 9 dias, as amostras foram analisadas e os discos de folhas foram novamente distribuídos em placas com meio de cultura para observar a recuperação do patógeno. Foram obtidos resultados satisfatórios com o isolado de *Clonostachys rosea* B-27, *Trichoderma* sp. H-18, Subtin (Metabólitos produzidos por *Bacillus subtilis*) e o fungicida tolyfluanid *in vitro* 24 horas antes da inoculação do patógeno *B. cinerea*. No terceiro experimento, realizado em mudas de *E. citriodora*, o delineamento experimental foi em blocos ao acaso com 8 repetições, e dois fatores. O primeiro fator consistiu de seis níveis de tratamentos (idêntico ao primeiro experimento), mais duas testemunhas. O segundo fator consistiu de 3 épocas de aplicação: 24 h, 48 h antes e simultaneamente à aplicação do *B. cinerea*. O *B. cinerea* apresentou baixa sensibilidade ao tratamento com *B. subtilis*, uma boa sensibilidade aos tratamentos com Subtin, *Trichoderma* sp. H-18, tolyfluanid e *S. cerevisiae*, alcançando um melhor resultado com *C. rosea*.

---

\* Comitê Orientador: Prof. Dr. Hilário Antônio de Castro - UFLA (Orientador), Edson Ampélio Pozza - UFLA, Wagner Bettiol - EMBRAPA.

## ABSTRACT

LOPES, Eloisa Aparecida das Graças Leite. **Biological Control of *Botrytis cinerea* In Vitro and on Seedlings of *Eucalyptus* sp.** 2001. 43p. Dissertation (Master's in Phytopathology) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG\*

The technology which has placed the forest enterprises into prominence in terms of seedling production has faced difficulties, mainly concerning to the incidence of fungal diseases. Among many fungal diseases which take place in forest nurseries of *Eucalyptus*, both grayesh mould and seedling lodging caused by *Botrytis cinerea* Pers. & Fries., stand out. The environment with high humidity and mild temperature is highly favorable to the development of the pathogen. The intense use of pesticides to control plant diseases and pests on crops and their consequence for the ecosystem have led the researchers to search for alternative methods control. In this context, biological control has been obtaining the most promising results. Therefore, the objective of this work was to evaluate the biological control of *B. cinerea*, employing *Bacillus subtilis*, a crude extract from *Bacillus subtilis* + culture medium (Subtin), *Clonostachys rosea*, *Trichoderma* sp. and *Saccharomyces cerevisiae*. Three experiments were performed in laboratory and misting chamber at the Phytopathology Department of UFLA. The experimental design of the two former trials was completely randomized in a factorial scheme with two factors and four replicates. Factor 1 consisted of 7 levels, corresponding to the treatments with biological control I - check, II - tolylfluanid (fungicide), III - *Bacillus subtilis*, IV - Subtin, V - *Clonostachys rosea*, VI - *Trichoderma* sp., VII - *Saccharomyces cerevisiae* and factor 2, to the periods of application of the pathogen. In the first experiment, application of the treatments and inoculation of the pathogen were carried out 24 hours before, 24 hours afterwards and simultaneous to the treatment. In the second experiment, the biological treatments were applied at 24 hours before, 48 and 72 hours before the inoculation of the pathogen. After 9 days containing incubation period, the samples were analyzed and the leaf disks were again allocated into plates containing culture medium, and the recovery of the pathogen. Was observed satisfactory results were obtained with the isolates of *Clonostachys rosea* B-27, *Trichoderma* sp. H-18, subtin and the fungicide tolylfluanid *in vitro* 24 hours before the pathogen *B. cinerea*. In the third experiment performed on *Eucalyptus citriodora* seedlings, the experimental design was randomized blocks, with 8 replicates and first experiment two factors. The first factor consisted of six levels of treatments plus two checks. The second factor consisted of three times of application: 24 and 48 hours before and simultaneously to the application of *B. cinerea*. *B. cineria* Shoneed low sensibility when treated *B. cineria* with *B. subtili*. *C. rosea* showed good sensibility whe treated with Subtin, *Trichoderma* sp. H- 18, tolylfluand e *S. cerevisiae*.

---

\* Guidance Committee: Hilário Antônio de Castro - UFLA (Major Professor) Edson Ampélio Pozza - UFLA, Wagner Bettiol - EMBRAPA.

## I INTRODUÇÃO

A eucaliptocultura brasileira ocupa posição de destaque entre as atividades do sistema produtivo do país, apresentando um faturamento médio anual de 5,3 bilhões de dólares. Recolhe cerca de 600 milhões de dólares em impostos e emprega diretamente 113 mil pessoas (Torres, 1997). Assim, é de fundamental importância a geração de tecnologia para reduzir custos e aumentar a eficiência produtiva desses povoamentos. A produtividade é prejudicada desde o viveiro, por causas bióticas e abióticas. Entre as causas bióticas, destacam-se as doenças fúngicas.

Segundo Von Stowasser (1996), praticamente todo consumo atual de fungicidas em viveiros de eucalipto, no Brasil, visa o controle do tombamento de mudas, cujos agentes etiológicos são *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Cylindrocladium scoparium* Morgan e *C. clavatum* Hodges e May, nos estádios de semeadura (S), pré-desbaste (PRÉ-D) e pós-desbaste (POS-D); e *Botrytis cinerea* Pers ex Fries. e *Cylindrocladium* spp., no estágio de fechamento de canteiros (F) (Ferreira, 1989; 1994). A produção de mudas em tubetes em canteiros suspensos, empregada por empresas brasileiras de nível tecnológico mais elevado, tem viabilizado a obtenção de mudas de eucalipto em larga escala, com um mínimo emprego de fungicidas no controle desta doença. Essa prática, associada a outras medidas utilizadas na produção de mudas, para controlar o tombamento de mudas, perfaz o manejo da doença.

Essas medidas, no entanto, não têm sido suficientes para o controle de *B. cinerea*, patógeno de ocorrência freqüente nos últimos 50-60 dias da produção de mudas e que tem acesso aos viveiros por via aérea, por meio de ventos (Ferreira, 1989; Souza, 1991; Ferreira, 1997b). Uma vez introduzido

nos viveiros, o fungo *B. cinerea* pode sobreviver em substrato orgânico, folhas mortas caídas na superfície dos recipientes e, também, em tecidos de mudas de eucalipto, como componentes da flora do filoplano (Souza e Ferreira, 1990; Souza, 1991). Nessa última condição, em situações especiais de temperatura de 20 e 24 °C e umidade 100% e hospedeiro, esse pode passar à condição de patógeno (Souza, 1991).

O controle químico da doença, embora muito usual, têm se mostrado inconsistente (Ferreira, 1989), pois é dificultado pelo desenvolvimento de populações resistentes de *B. cinerea* aos produtos utilizados (Ghini e Krugner, 1987). Outro fator desfavorável é a lavagem do princípio fungitóxico pelas freqüentes irrigações (Ferreira, 1989). Além disso, o uso indiscriminado desses produtos pode trazer conseqüências indesejáveis ao homem e ao ambiente.

Com o conhecimento dos problemas advindos do uso de fungicidas, tem ocorrido grande procura por métodos alternativos de controle de doenças de plantas e o controle biológico passou a ser intensamente explorado. Diversos fungos e bactérias antagonicas estão sendo pesquisados como alternativas para os fungicidas e têm demonstrado efetivo controle de várias doenças.

Essas ponderações, aliadas às informações de resultados promissores de controle biológico de *B. cinerea* em outras culturas (Peng e Sutton, 1991; Peng et al., 1992; Sutton et al., 1995; Sutton et al., 1997), conduziram à realização do presente trabalho, com os seguintes objetivos: i) avaliar agentes de controle biológico *in vitro* em discos de folhas destacadas de eucalipto no crescimento e esporulação de *Botrytis cinerea*; ii) avaliar os mesmos agentes de biocontrole em mudas de eucalipto no controle da podridão cinzenta.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Taxonomia de *Botrytis* sp.

*Botrytis* sp. é um fungo mitosporico, tendo teleomorfo no filo ascomicota, da ordem Helotiales e família Sclerotiniaceae, do gênero *Botryotinia* sp. (Alexopoulos et al., 1995 e Hawksworth et al., 1995). A produção de conídios é abundante, tanto em meios de cultura como em tecidos de hospedeiros infectados. Formam escleródios bem desenvolvidos, com variação de tamanho desde poucos milímetros até mais de 1cm, de coloração negra tanto em meio de cultura como em restos culturais, que determinam a sobrevivência do patógeno em condições adversas (Kimura, 1999; Agrios, 1997; Krugner e Bacchi, 1995; Ferreira, 1989 e Jarvis, 1980).

### 2.2 Ciclo da doença causada por *Botrytis* sp.

O ciclo da doença desenvolve-se do seguinte modo: saprofiticamente o fungo sobrevive em folhas e outros órgãos vegetais mortos, especialmente de seus hospedeiros na superfície do solo. Sobre os tecidos desses materiais, o fungo produz hifas e escleródios. Os escleródios podem garantir-lhe sobrevivência em condições de ambiente desfavorável às hifas normais. *Botrytis* spp. pode infectar culturas em quase todos os estádios de desenvolvimento, também durante o transporte, afetando todos os órgãos da planta, incluindo cotilédones, folhas, hastes e flores, o que torna seu controle muito difícil (Gullino, 1992).

Em condições de temperatura de 20 e 24 °C e umidade 100% (Souza, 1991), os escleródios germinam produzindo hifas aptas a colonizar tecidos vegetais saudáveis ou necrosados, produzir conidióforos e conídios. Os conídios de *Botrytis* sp., devido ao seu tamanho, são facilmente disseminados pelo

vento ou pela água. Ao serem depositados na superfície do hospedeiro suscetível e em condições de ambiente favorável, germinam formando tubos germinativos que invadem e posteriormente colonizam, através da formação do micélio, os seus tecidos. *Botrytis* sp. causa tombamento de mudas de eucalipto somente no estágio de fechamento de canteiros (Ferreira, 1989), sendo inclusive o patógeno predominante nesse estágio. Os esporos provenientes de outras fontes de inóculo são levados pelo vento até a copa das mudas e, em seguida, são lavados pela água de irrigação ou pela chuva, são depositados em folhas de eucalipto necrosadas na superfície dos recipientes, sob a copa entrelaçada das mudas, iniciando-se a colonização saprofítica, seguida de intensa produção de estruturas reprodutivas do fungo na superfície do substrato.

O primeiro indício de infecção de *Botrytis* sp. em eucalipto no estágio de fechamento de canteiros é a esporulação do fungo, vista a olho nu, sobre folhas necrosadas na superfície dos recipientes, iniciando pela formação de mofo marrom-acinzentado ou prateado. Daí, seus conídios são salpicados para folhas senescentes, mas ainda presas às mudas, onde germinam.

As primeiras infecções de hastes das mudas pelo patógeno ocorrem quando essas fazem contato direto com os limbos senescentes, colonizados e esporulados, ou pela continuidade de colonização limbo senescente-pecíolo-haste. Elevada umidade e temperaturas de 20 e 24 °C (dias com alta umidade relativa) são as condições mais favoráveis para as infecções e esporulação de *Botrytis* sp. Nessas condições, as lesões das hastes mostram-se rapidamente esporuladas. Por isso, uma característica do ataque de *Botrytis* sp. no estágio de fechamento de canteiros é a presença de lesões em diferentes alturas da haste acima da área com casca externa madura, inclusive em galhos e folhas vivas da copa das mudas (Ferreira, 1997a).

### **2.3 Controle Biológico de fitodoeças**

A utilização intensa de pesticidas para o controle de fitodoeças e pragas em culturas de interesse agrícola e suas conseqüências para o ecossistema induziram os pesquisadores a buscar métodos alternativos de controle. Nesse contexto, várias pesquisas têm sido realizadas, demonstrando a eficiência do controle biológico. Em ecossistemas naturais, o antagonismo a fitopatógenos ocorre espontaneamente e contribui para menor ocorrência de epidemias severas e destrutivas em comparação a agroecossistemas. É interessante, portanto, do ponto de vista fitossanitário, identificar e explorar comercialmente essas interações (Melo, 1996). O principal objetivo do controle biológico é manter, por meio do emprego de determinadas práticas (introdução de uma biomassa de antagonistas), todos os componentes do agroecossistema em equilíbrio, (hospedeiro cultivado juntamente com os patógenos e os organismos úteis). Tais níveis de equilíbrio poderão ser alcançados elaborando-se um sistema integrado de produção, com destaque ao controle biológico sem perdas significativas na produção agrícola, com as vantagens de se obter maior economia e menores riscos ao meio ambiente (Bettiol, 1991). Segundo Baker e Cook (1974), o mundo biológico é “uma vasta rede de interações de populações ativas em estado de equilíbrio dinâmico, que refletem em mudanças no seu ambiente físico e nas relações uns com os outros”.

Dentre os microrganismos encontrados no filoplano, incluem-se bactérias, fungos leveduriformes e filamentosos. A população dominante nesse ambiente varia de acordo com o estágio de desenvolvimento do vegetal e com as condições climáticas (Bettiol, 1997).

O uso do controle biológico em substituição ao químico, é dependente da disponibilidade e da efetividade dos agentes de controle, bem como dos produtos comerciais contendo estes microrganismos. Entretanto,



até o momento, são poucos os produtos biológicos disponíveis no mercado para essa modalidade de controle. Além disso, a maioria não é devidamente registrada para o uso em escala comercial. O uso de controle biológico em pós-colheita, é o que está mais avançado (Siqueira Franco, 1999). De acordo com Valdebenito-Sanhueza (2000), o produto biológico *Aspire* é registrado em Israel e USA para ser utilizado em doenças de frutos cítricos durante o período de pós-colheita. Para esta mesma cultura, relata também a utilização das leveduras *Debaromyces hansenii* e *Rhodotorula mucilaginosa* para o controle do *Penicillium digitatum* (Siqueira Franco, 1999).

Cook e Baker (1983) estudaram o parasitismo do *Trichoderma viride* a *Rhizoctonia solani*, causando tombamento em plantas, obtendo resultados promissores e eficientes para encorajar investigações futuras sobre os fungos biocontroladores.

### **2.3.1 Mecanismos das interações antagonistas**

A dinâmica do equilíbrio biológico prevalente nos ecossistemas naturais depende, entre outros fatores, da relação entre os habitantes microbianos (Henis e Chet, 1975). Essas interações complexas podem ser de categoria neutra, benéfica ou detrimento. De acordo com Blakeman e Fokkema (1982), o conhecimento sobre os mecanismos de antagonismo dos organismos colabora na determinação da época, da forma e da quantidade adequadas para aplicação dos antagonistas.

Os mecanismos pelos quais as interferências entre microrganismos patogênicos e fungos antagonistas ocorrem são divididos em antibiose, competição, parasitismo, predação, hipovirulência e indução de defesa no hospedeiro (Cook, 1985). Embora exista esta divisão, um agente antagonista pode atuar por um ou mais mecanismos, e quando se têm esta condição, maiores são as chances de êxito no controle.

### **2.3.2 Microrganismos antagônicos**

Os microrganismos antagônicos do filoplano consistem basicamente de bactérias e fungos (filamentosos e leveduriformes). Nesse ambiente é intensa a competição, principalmente por nutrientes, entre a antibiose, o parasitismo e a indução de resistência, resultando num controle natural de doenças foliares (Bettiol, 1991). Também, segundo Tatagiba (1996), bactérias e fungos saprófitas crescem na superfície das plantas, podendo impedir o desenvolvimento de patógenos através da produção de metabólitos e ou do consumo de exsudados. Esse tipo de interação entre as plantas e a população microbiana epífita é um dos principais mecanismos de controle de fungos, que necessitam de uma fonte externa de açúcares para causar infecção, como *B. cinerea* (Blakeman e Fokkema, 1982). Em trabalhos realizados por Baker e Cook (1974), folhas apresentando sinais de ferrugem e oídios, colonizadas por ácaros e outros organismos, apresentaram maior população de epífitas residentes em comparação a folhas saudias. Por sua vez, Blakema e Fokkema (1982) sugerem que, na busca de microrganismos antagônicos a determinado patógeno, agente de doenças em parte aérea, deve-se coletar folhas saudias existentes em campos onde se tenham plantas doentes.

#### **2.3.2.1 *Trichoderma* sp. e *Gliocladium roseum***

*Trichoderma* spp. tem sido testado em muitos casos como antagonista de diversos patógenos. A atividade antagonística de algumas espécies de *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. viride*) é o resultado de diferentes mecanismos que ocorrem ao mesmo tempo, como a competição, antibiose ou ação direta do parasita (Chet, 1987). No caso do mofo cinzento em videira, tanto a competição como o micoparasitismo estão implicados no controle biológico de *B. cinerea*. Competição entre os dois

antagonistas ocorre durante a colonização de fragmentos ou partes florais. A ação do tratamento com antagonista durante o período de desenvolvimento floral é importante porque o *Trichoderma* sp. vai colonizando os resíduos florais, mais rapidamente que a colonização saprofítica das flores por *B. cinerea*. Também Dubos (1987) observou o micoparasitismo de *Trichoderma* sp. sobre *B. cinerea* na videira. Frutificações do antagonista foram observadas na margem entre a área necrótica e a sadia dos frutos. Na extensão de ataque do parasita nos frutos necrosados, foram observadas ao microscópico de luz, hifas e penetração de micélio de *Trichoderma* sp. parasitando *B. cinerea*.

Utilizando os mesmos princípios, Elad e Cohen (1991) formularam um pó molhável de *T. harzianum* (T-39), efetivo para aplicações comerciais no campo e casa-de-vegetação, visando ao controle do mofo-cinza em hortaliças, roseiras e parreiras. Pulverizações em parreiras, com o produto formulado na proporção de 0,1- 0,4%, resultaram em controle de infecções na ordem de 40-47%. O controle foi similar àquele alcançado com os fungicidas iprodione ou dietofencarb + carbendazim. Em parreiras, quatro aplicações foram feitas, alternando *Trichoderma* com os fungicidas mencionados ou com folpet. A substituição de duas pulverizações regulares por *Trichoderma* resultou em controle similar ao das quatro pulverizações baseadas nos fungicidas isoladamente. Em alguns experimentos os resultados sugerem, portanto, que esse agente de biocontrole pode substituir as aplicações de fungicidas em 50%, possibilitando a redução da pressão de seleção no surgimento de resistência aos fungicidas nas populações de *B. cinerea*.

Belanger et al. (1995), estudando os acontecimentos cronológicos associados às propriedades antagonísticas de *Trichoderma harzianum*, associado com *Botrytis cinerea* através da evidência indireta do papel

seqüencial do parasitismo e antibiose, verificaram que ocorreu degradação de *B. cinerea* por uma estirpe de *T. harzianum* selecionada como antagonista. Utilizaram-se, para caracterizar tal estudo, investigações de estrutura citoquímica para tentar, assim, definir os papéis relativos da antibiose e do parasitismo nos processos de antagonismo. As primeiras mudanças ultra-estruturais foram observadas a partir de 12 horas após o contato entre os organismos antagonistas, sendo caracterizadas por invaginações em *B. cinerea*. Essas reações foram seguidas por uma retração gradual do plasmalema; desorganização do citoplasma; perda da pressão; perda do turgor e morte das células em 48 horas após o contato das hifas de *B. cinerea* com os fungos atuantes. As primeiras evidências da ação do *T. harzianum* sobre o *B. cinerea* foram registradas após 72 horas do primeiro contato, quando ocorreu a penetração de hifas do antagonista, sendo medida por pressão mecânica ou por digestão localizada na parede celular nos pontos de entrada. Após 10 dias da penetração, houve degradação da quitina, baseada na presença aleatória e reduzida de partículas amareladas sobre a parede celular do *B. cinerea*. Observou-se que a estirpe de *T. harzianum* antagonizou primeiro por antibiose, levando à morte da célula, seguindo-se da degradação da célula por meio de enzimas picnolíticas. Trabalhos de Von Stowasser (1996) com *Trichoderma viride* Person ex Fries, originário de composto orgânico, apresentou efetividade de 100% com relação à supressão de *B. cinerea*, semelhante ao obtido por Peng e Sutton (1991) e Zhuang et al. (1994), quando avaliaram a supressão do patógeno em discos de folha de morangueiro em segmentos de acículas de *Picea mariana* (Mill).

*Gliocladium roseum* passou a ser considerado como antagonista potencial a *B. cinerea* no final da década de 80, em estudos do biocontrole do mofo cinzento em morangueiro (Peng e Sutton, 1990).

Sutton (1994) menciona que todas as linhagens de *G. roseum* isoladas de diferentes regiões geográficas foram altamente efetivas em controlar *B. cinerea*. Três ou quatro aplicações semanais ( $5 \times 10^6$  ou  $5 \times 10^7$  conídios/ mL) reduziram completamente *B. cinerea* em frutos de cultivares de inverno. O controle foi tão efetivo quanto o tratamento com captan. O antagonista foi eficiente no controle do patógeno em outros hospedeiros, como gerânio, begônia, ciclamen, *Exacum affine*, tomateiro, pimentão, pepino, framboesa, seedlings de abeto preto e outras coníferas (Sutton et al., 1997). Um isolado de *G. roseum* propiciou reduções de até 100% na esporulação de *B. cinerea* em restos culturais de roseira (Tatagiba, 1996).

Trabalhos realizados por Von Stowasser (1996) demonstraram ótimos resultados na supressão de *Botrytis cinerea* em folhas destacadas de eucalipto. Observou-se também que esse fungo apresentou boa capacidade de colonização de porções de hastes e folhas mortas por fator abiótico. Essa característica é altamente desejável em qualquer antagonista, para o biocontrole de *B. cinerea*.

*Gliocladium roseum* estabeleceu-se endofiticamente em folhas verdes, senescentes ou mortas de roseira e suprimiu a esporulação do patógeno em mais de 96%. *G. roseum* pode atuar no controle de *B. cinerea* por colonizar o substrato antes e mais eficientemente que o patógeno, micoparasitar hifas e conidióforos do patógeno e reduzir significativamente sua esporulação (Morandi, 1997; Morandi et al., 2000).

*Trichoderma* spp. e *Gliocladium* spp., têm sido usados no controle de *B. cinerea*. A concentração de inóculo é fundamental para a supressão da doença. No campo, a concentração de  $10^8$  conídios/ mL foi efetiva em reduzir a densidade populacional de *B. cinerea* (Dubos, 1984). Aplicações de *Trichoderma viride* e de *Trichoderma harzianum*, na concentração de  $10^7$

conídios /ml, três vezes durante o florescimento de morangueiro, reduziram o índice de infecção natural de *B. cinerea* (Tronsmo e Dennis, 1977).

### **2.3.2.2 *Bacillus* spp. e seus metabólitos**

Muitos trabalhos demonstram o potencial de controle biológico de doenças foliares por meio de manejo de bactérias residentes ou não no filoplano. Dentre estas bactérias, *Bacillus* spp. é freqüentemente encontrada no filoplano de muitas espécies vegetais (Bettiol, 1988). *Bacillus subtilis* Cohn é descrita como bactéria móvel, aeróbica, gram-positiva, em forma de bastonete, com flagelos peritríquios e que ocorre em diversos ambientes, podendo, em condições adversas, produzir esporos para sobreviver (Sneath, 1986). A capacidade de produção de antibióticos pode ser uma das maneiras pelas quais *B. subtilis* exerce antagonismo a várias espécies de fitopatógenos (Gottlieb e Shaw, 1970).

Bettiol et al. (1988) verificaram a existência de uma microflora antagonística e patógenos no filoplano por isolamento de *Bacillus* da superfície foliar de *Eucalyptus grandis*. Os resultados obtidos permitem concluir que *Bacillus* sp. produz antibióticos para controlar o crescimento de *Cylindrocladium scoparium*.

### **2.3.2.3 *Saccharomyces cerevisiae***

As leveduras, como componentes do filoplano (Phaff e Starmer, 1987), podem ser utilizadas no controle de doenças como medida alternativa (Fokkema et al., 1979; Williamson et al., 1985; Wisniewski et al., 1991; Urquhart et al., 1994). As leveduras fazem parte do ambiente no qual se desenvolvem as plantas, da microbiota epífita e endófito, sendo encontradas também no solo. São ativas consumidoras de nutrientes, efetivas como colonizadoras de fermentos e, em alguns casos, indutoras da resistência do

hospedeiro. Desta forma, estes organismos agem no controle das doenças preferencialmente como preventivos da infecção, e não como curativos (Valdebenito-Sanhueza, 2000).

Piccinin (1995), usando *S. cerevisiae* na proteção de plantas de sorgo, maracujá-azedo amarelo e eucalipto contra fitopatógenos fúngicos e bacterianos, verificou a inexistência de especificidade no controle de diferentes patógenos por *S. cerevisiae*, além do efeito da proteção inespecífico para o hospedeiro.

#### 2.4 Controle Químico

Com base em literatura (Andrei, 1999), não existe fungicida registrado para o controle de tombamento de mudas em *Eucalyptus* sp. causado por *Botrytis* sp., sendo utilizados fungicidas registrados para outras culturas (Andrei, 1999). Com isso, ocorre o uso desordenado e sem acompanhamento correto, aumentando o risco de utilizar uma dosagem além do necessário, bem como intervalos inadequados de aplicação. Além disso, ocorre a utilização incorreta de mais de um fungicida com intervalos de aplicação variando de 02 dias entre um fungicida e outro e também variando as dosagens como uma forma de obter a melhor eficiência de controle, dando a falsa idéia de que esse coquetel irá controlar eficientemente a necrose da parte aérea em mudas de *Eucalyptus* sp. *Botrytis cinerea* apresenta alta capacidade de adquirir resistência a fungicidas, pois produz, geralmente, grande quantidade de conídios, que são facilmente disseminados, e com grande variabilidade genética (Ghini e Kimati, 2000).

Os testes *in vitro* realizados por Tatagiba et al. (1995) com incorporação de fungicidas no solo em restos de culturas de roseira em placas de Petri, para o controle do mofo-cinza causado por *Botrytis* sp., demonstraram que os fungicidas vinclozolin, dicloran, propiconazole e

tebuconazole, na concentração de  $\pm 25\%$  inferior e superior à recomendada, inibiu completamente o crescimento micelial. Monteiro (1996) obteve isolados de *Botrytis cinerea* de roseira resistentes a benzimidazóis e dicarboximidas em cultivos nos quais esses fungicidas foram largamente utilizados. Em condições controladas, esse autor verificou que os fungicidas vinclozolin, diclofuanid e mancozeb reduziram em 81,9, 85,7 e 96,2%, respectivamente, o número de lesões causadas pelo patógeno em botões de rosa. Caldari Júnior (1998) verificou alguns isolados de *B. cinerea* com possível resistência ao triazol difenoconazole crescendo na concentração de 100 ppm do fungicida, entretanto, Ghini (1996) não detectou isolados de *B. cinerea* resistentes ao triazol propiconazole.

Kimura (1999), no Brasil, não há estudo de resistência de fungos ao fungicida tolylfluanid (similar ao dichlofluanid), entretanto, tolylfluanid é um inibidor muito eficaz da germinação de esporos e de micélio. Numerosos estudos sobre o mecanismo de ação do tolylfluanid mostram que o ingrediente ativo, pertencente ao grupo de bloqueadores de SH (grupo tiol), interfere no metabolismo da célula do fungo, atuando de modo não específico em numerosos locais. O mecanismo de ação baseia-se na interação direta do ingrediente ativos com grupos SH proteínas contendo enxofre, enzimas ou constituintes das células com baixo teor molecular, como a coenzima A.

Dichlofluanid e chlorotalonil foram utilizados como alternativas de baixo risco para o fungo adquirir resistência. Malathrakis (1989) constatou isolados de *B. cinerea* resistentes ao dichlofluanid, na concentração maior ou igual a 81 $\mu\text{g/mL}$ , quando avaliou o crescimento micelial e germinação dos esporos. Rewal et al. (1991) verificaram que isolado com baixo nível de resistência a dichlofluanid teve o  $\text{EC}_{50}$  para o crescimento micelial de 3,2  $\mu\text{g/mL}$ , e os com ultra baixa resistência, de 1,3 $\mu\text{g/mL}$ . De 76 isolados de *B. cinerea* coletados em casa-de-vegetação, 55 deles apresentaram-se resistentes



ao dichlofluanid, quando ocorreu falha no controle da doença, sendo esse o primeiro relato de resistência ao dichlofluanid. Em casa-de-vegetação com baixo inóculo de *B. cinerea*, os fungicidas dichlofluanid, captan e chlorotalonil foram eficazes contra o mofo cinzento. O isolado resistente a dichlofluanid foi também ao vinclozolin; porém, o isolado resistente a dichlofluanid revelou falta de adaptabilidade quando comparado com o isolado sensível. Segundo Wade (1994) quando não se pode evitar o emprego de um determinado fungicida propenso a induzir resistência, deve-se minimizar a pressão de seleção exercida por ele sobre o patógeno por: a) aplicação somente em época críticas do ano; b) redução da dose e frequência de aplicação ao mínimo necessário para o controle econômico; c) seleção de um método de aplicação que minimize a exposição do patógeno ao químico; d) limitação da área tratada; e) aplicação do produto, curativamente, logo após o início da infecção; f) aplicação do produto em combinação com outras medidas de controle.

Nesta última década, têm sido formuladas misturas de fungicidas de sítio específico com fungicidas de contato como estratégias para minimizar os riscos de indução de resistência de fungos a fungicidas (Sander et al., 1985; Samoucha e Gisi, 1987; Samoucha e Cohen, 1988). Como medida preventiva contra a resistência de fungos a fungicidas, empresas formuladoras estão introduzindo no mercado a pré-mistura de fungicidas sistêmicos e protetores, como thiran + carboxin, mancozeb + metalaxyl, cyproconazole + oxiclreto de cobre, tiofanato metílico + chlrotalonil (Andrei, 1999).

Segundo Kimura (1999), estudos com fungicidas no controle de *B.cinerea* indicam a eficiência *in vitro* e *in vivo* dos benzimidazóis e dicarboximidas. Entretanto, poucos trabalhos foram realizados com outros fungicidas, como os triazóis e outros compostos não testados no controle do

patógeno. Vários trabalhos relacionados à resistência de *B. cinerea* a fungicidas indicam a facilidade deste fungo em adquirir resistência aos benzimidazóis e dicarboximidas, quando o fungo sofre pressão de seleção por estes fungicidas, causando infecções e disseminações do patógeno *B. cinerea*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no laboratório de Controle de Enfermidades de Plantas e câmara de nebulização do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras- MG.

Utilizaram-se mudas de eucalipto apresentando sintomas típicos de *Botrytis* sp., provenientes de um viveiro comercial, situado em Mogi-Guaçu - SP, no período de agosto/98 a dezembro/98. As amostragens foram realizadas separadamente nas casas-de-vegetação, sombrite, telado, viveiro a pleno sol e no microjardim clonal. As amostras consistiram de estacas e micro estacas de *Euclyptus grandis* Hill ex Maidem com sintomas de *Botrytis* sp.; foram retiradas dos tubetes e acondicionadas em sacos de papel com sua devida identificação (local, data de plantio, clones e data de coleta); e também foram coletados solo e substrato de mudas de *E. grandis* com 10 a 70 dias em tubetes.

#### **3.1 Isolamento dos fungos antagonistas localizados no solo e substrato usado nos tubetes**

De cada amostra de solo e substrato, foi retirada uma sub-amostra de 10 gramas, suspensa em 100mL de água destilada esterilizada (ADE) contendo 2g de ágar/1000 mL e submetida à agitação mecânica durante 20 minutos, com a finalidade de homogeneizar a suspensão. Logo após, foram feitas diluições em série com agitação de 1 minuto entre as diluições. Foram estabelecidas diluições de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  para isolamento dos fungos. De cada uma dessas diluições, pipetou-se uma alíquota de 1,0mL, que foi colocada em placas de Petri de 9,0cm de diâmetro sobre meio BDA + 50ppm de Cloranfenicol. As placas preparadas foram incubadas a 20 °C por 48

horas, com 12 horas luz. Fragmentos das colônias de fungos desenvolvidas nestas condições foram transferidos individualmente para placas de Petri contendo meio BDA, mantidas nas mesmas condições de temperatura e luminosidade. Esta técnica foi utilizada por Illipronti Junior (1991) e descrita em detalhes por Dhingra e Sinclair (1985). Após este período, foram retirados, assepticamente, discos de 5,0 mm de diâmetro da extremidade das colônias desenvolvidas nas placas de Petri, que foram transferidos para tubos de vidro inclinados de 15cm de comprimento por 1,5 cm de diâmetro contendo o meio BDA e mantidos em geladeira.

### **3.2 Isolamento de *B. cinerea* e antagonistas a partir de mudas e de micro estacas de *Eucalyptus grandis***

O isolamento de *Botrytis* sp. e organismos antagonistas foi feito a partir de estacas, micro estacas e plantas jovens de *E. grandis*. Fragmentos do material vegetal foram tratados com álcool 50%, ( 1 minuto), hipoclorito de sódio a 1% (1 minuto) e lavados em água destilada esterilizada (1 minuto). Em seguida, foram transferidos para placas de Petri de 9cm de diâmetro contendo meio BDA + 50ppm de cloranfenicol ou papel de filtro umedecido com ADE ("blotter test"). As placas preparadas foram mantidas a 20 °C por 7 dias, com 12 horas de luz. Fragmentos das colônias de fungos desenvolvidas nestas condições foram transferidos individualmente para placas de Petri contendo meio BDA, mantidas nas mesmas condições de temperatura e luminosidade. Após este período, foram retirados, assepticamente, discos de 5,0 mm de diâmetro da extremidade das colônias, desenvolvidos nas placas de Petri, e transferidos para tubos de vidro inclinados contendo meio BDA, que foram mantidos em geladeira. As repicagens foram realizadas a cada 6 meses, com revigoramento da capacidade antagonista/patogênica do organismo.

### **3.3 Seleção inicial e identificação dos possíveis antagonistas e agentes utilizados**

Todos os isolamentos fúngicos com esporulação em tubos de BDA foram agrupados de acordo com o mesmo tipo de colônia e esporulação, a partir de observações a olho nu e, posteriormente, em microscópio ótico. De cada isolado com a mesma identidade, escolheu-se uma cultura, descartando-se as demais.

O isolado de *Trichoderma* sp. clone H-18, isolado do Microjardim clonal do viveiro florestal, apresentou-se como melhor agente antagonista. Por este motivo, ele foi escolhido para os trabalhos desenvolvidos *in vitro* e *in vivo*.

Foi utilizado o isolado de B-27 de *Clonostachys rosea* (Link: Fr.) Schroers et al., (1999) que era classificado como *Gliocladium roseum*, proveniente da Micoteca do Dr. Sutton- Canadá; e o isolado de *Bacillus subtilis* AP-3 e seus metabólitos (subtin), ambos cedidos pela EMBRAPA-CNPMA, Jaguariúna-SP.

Utilizaram-se, também, células de *Saccharomyces cerevisiae* Meyen, adquiridas no comércio local.

### **3.4 Preparo da suspensão de células de *Bacillus subtilis*, seus metabólitos (subtin) e células de *Saccharomyces cerevisiae***

O isolado de *B. subtilis* AP-3 foi cultivado em placas de Petri contendo meio BDA e mantidas em BOD a 25<sup>o</sup> C por 48 horas. Após esse tempo, foi preparada a suspensão bacteriana, adicionando-se às placas 10 mL de solução salina 0,85%, homogeneizando com a alça de Drigalsky e filtrando, posteriormente, com gaze esterilizada. A concentração da suspensão foi medida e ajustada em câmara de Neubauer para 2,0 x 10<sup>8</sup>

células/mL, conforme metodologia utilizada no laboratório de Fitopatologia/CNPMA-EMBRAPA.

Para obter metabólitos de *B. subtilis*, foram utilizadas 4 placas de Petri contendo culturas puras de *B. subtilis* com 48 horas em meio de cultura BDA, as quais foram repicadas para quatro erlenmeyers contendo 100 mL de meio líquido (BD). Os erlenmeyers foram mantidos em agitação por 24 horas, a 25 °C. Após esse período, o conteúdo de cada frasco foi transferido para uma cuba de vidro contendo 5 litros de GPZA (Glucose 1%, Peptona 1%, Extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,3%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1%, MgSO<sub>4</sub> 0,05% e 1.0L de AD), na qual permaneceu por 7 dias em agitação constante para fermentar. Para retirar as células bacterianas, os caldos em que *B. subtilis* foi multiplicado foram previamente centrifugados em centrífuga tipo "Sharpless" a 23.000 rpm e vazão em torno de 55 mL por minuto. Os metabólitos foram obtidos por precipitação, utilizando-se a diminuição do pH até aproximadamente 2,0 com solução de HCl. Para facilitar a separação dos precipitados e dos filtrados com funil de vidro sinterizado, o caldo com o precipitado foi deixado em repouso para decantação. O precipitado de consistência pastosa foi diluído em água na concentração de 5.000 ppm (Bettiol et al., 1994).

Nos testes realizados em mudas de *Eucalyptus citriodora*, utilizou-se a concentração de 10.000 ppm (Bettiol et al., 1994).

Para obter suspensões de células de *Saccharomyces cerevisiae*, foi utilizado o "Fermento Biológico Fleischmann" (FBF) (Fleischmann Royal Jundiaí - SP). *Saccharomyces cerevisiae* Meyen, (fermento de padaria) adquirido no comércio local em embalagens de 20g cada e mantido sob frigeração (4 °C) até o uso. Foi utilizada uma concentração do fermento biológico comercial 25mg/mL, ou seja, um tablete de 15g de fermento dissolvido em 600mL de água destilada esterilizada (Lopez, 1991; Piccinin,

1995). A suspensão foi transferida para erlenmeyer, agitada por 10 minutos em agitador magnético e mantida nas condições ambiente até a inoculação (Roncatto, 1997).

### **3.5 Cultivo e preparo do inóculo de *Clonostachys rosea* B-27 e *Trichoderma* sp. H- 18**

*Clonostachys rosea* B-27 e o isolado H-18 de *Trichoderma* sp., isolado a partir de solo do Microjardin clonal, foram cultivados em placas de Petri contendo meio aveia (30g de flocos de aveia, 20 g de agar e 1,0 L de ADE) e mantidas em BOD a  $20 \pm 2^\circ$  C com 12 horas de luz.

As suspensões de conídios desses fungos foram obtidas adicionando-se 10mL de ADE mais Tween 80 na proporção de 0,05% às placas contendo culturas puras de 10 dias. Após homogeneização com alça de Drigalsky, a suspensão foi filtrada com gaze esterilizada e a concentração ajustada, em câmara de Neubauer, para  $2 \times 10^7$  conídios/ mL.

### **3.6 Cultivo e preparo do inóculo de *Botrytis* sp.**

O isolado de *Botrytis* sp. clone H-18, isolado do Microjardim clonal obtido a partir de mudas do viveiro florestal do município de Mogi-Guaçu-SP, foi identificado como *Botrytis cinerea*. O isolado foi cultivado em meio PCA (20g de batata lavada e descascada, 20 g de cenoura lavada e descascada, 20 g de agar, e 1,0L de AD) mais 50ppm de Cloranfenicol (Tuite, 1969) , por 10 dias a  $20 \pm 2^\circ$  C em BOD, com 12 horas de luz.

As suspensões de conídios de *B. cinerea* foram obtidas da mesma forma utilizada por *C. rosea* e *Trichoderma* sp. H-18, conforme descrito em 3.5. As concentração das suspensões foi ajustada para  $2,0 \times 10^6$  conídios/mL.

### 3.7 Fungicida

Para comparar o controle biológico, utilizou-se uma suspensão do tolylfluand na concentração de 500ppm do ingrediente ativo (Yamashita et al., 1997) no experimento realizado *in vitro*. E no experimento com as mudas de eucaliptos, utilizou-se uma concentração de 1.000ppm.

### 3.8 Efetividade dos antagonistas na supressão de *B. cinerea* em discos de folhas de *Eucalyptus grandis* *in vitro* (1<sup>o</sup> experimento)

Para testar a efetividade dos antagonistas e do fungicida na supressão de *B. cinerea in vitro*, foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado em análise fatorial com dois fatores e quatro repetições. O fator um foi constituído por 7 tratamentos: I- Água destilada esterilizada (testemunha), II- Tolylfluand, III- *Bacillus subtilis*, IV- Subtin, V- *Trichoderma* sp. H-18, VI- *Clonostachys rosea* B-27 e VII- *Saccharomyces cerevisiae*; e o fator dois, foi representado por 3 intervalos de aplicação dos tratamentos: I- tratamento com antagonistas 24 horas antes de *B. cinerea*, II- antagonista simultâneo à inoculação do *B. cinerea* e III- antagonistas 24 horas após a aplicação com *B. cinerea*, com um total de 21 tratamentos. Cada placa com 12 discos foi considerada uma repetição. Utilizaram-se discos de 10mm de diâmetro de folhas novas de *E. grandis* sem sintoma de deficiência mineral, segundo metodologia citado por Ghini (1984). Os discos de folhas, com as faces inferiores voltadas para cima, foram dispostos em bandejas sobre papel toalha umedecido com ADE. As suspensões com os tratamentos antagonistas foram pulverizadas sobre os discos de folhas com um microaspersor manual e as bandejas foram mantidas em sala com ar condicionado até a secagem dos discos, obedecendo às ordens definidas para os intervalos de aplicação. Em seguida, os discos foliares foram transferidos para placas de Petri de 9cm de diâmetro contendo 15mL





de ADE, que foram mantidas em BOD a  $20 \pm 2$  °C por 24 horas. Após esse tempo, os discos foram novamente transferidos para bandejas com papel toalha e sobre eles foi pulverizada a suspensão de conídios de *B. cinerea*. Os discos, após secagem, voltaram para as placas de Petri, que foram mantidas em BOD por 9 dias. Nos casos dos tratamentos com aplicação dos antagonistas simultaneamente e 24 horas depois, seguiu-se a mesma descrição do tratamento com o antagonista 24 horas antes. Após as leituras dos discos realizada em microscópio estereoscópio, foi retirado o excesso de umidade dos discos foliares, os quais foram transferidos para papel de filtro esterilizado e, após 10 minutos, para placas de Petri de 9cm de diâmetro contendo meio PCA + 50ppm de Cloranfenicol, que foram mantidas em BOD a  $20 \pm 2$  °C, com 12 horas de luz por 10 dias. Após esse tempo, avaliou-se a porcentagem de discos foliares em que houve crescimento de *B. cinerea*.

### 3.9 Avaliação dos resultados e avaliação estatística

Nove dias após o tratamento dos discos foliares com os antagonistas, avaliou-se ao microscópio estereoscópico a porcentagem da área de cada um deles coberta com esporos e/ ou micélio de *B. cinerea*. Para avaliação, utilizou-se a escala proposta por Von Stowasser (1996), com notas variando de 0 a 4, onde 0=0%; 1=1-25%; 2=26-50%; 3=51-75% e 4=76-100%.

Os dados obtidos com a variável nota foram submetidos à média ponderada:

$$N = \sum_i^n \frac{X_i * \text{nota}}{Y}$$

Sendo:

X = número de discos com sintomas

Y = número total de discos avaliados

As análises estatísticas foram feitas pelo programa SISVAR (1999), versão 4.3, utilizando-se o teste Scott-Knott para as comparações múltiplas de médias. Todos os dados seguiram distribuição normal.

### **3.10 Época de aplicação dos tratamentos antagonistas (2º experimento)**

Após verificar maior efetividade dos antagonistas quando os mesmos foram aplicados antes de *B. cinerea*, montou-se novo ensaio para determinar qual o melhor intervalo de aplicação entre os antagonistas e o patógeno.

O ensaio foi montado como descrito em 3.8, com o mesmo delineamento experimental, mesmos tratamentos e mesmo procedimento para avaliação. Foram alterados, no entanto, os intervalos de aplicação entre os tratamentos antagonistas e *B. cinerea*, que passaram a ser: I- antagonistas 24 horas antes de *B. cinerea*; II- antagonista 48 horas antes de *B. cinerea* e III- antagonistas 72 horas antes de *B. cinerea*. Após a avaliação, foi retirado o excesso de umidade dos discos foliares, os quais foram transferidos para papel de filtro esterilizado e, após 10 minutos, para placas de Petri de 9cm de diâmetro contendo meio PCA + 50ppm de Cloranfenicol, que foram mantidas em BOD a  $20 \pm 2^{\circ}$  C com 12 horas de luz, por 10 dias. Após esse tempo, avaliou-se a porcentagem de discos foliares onde houve crescimento de *B. cinerea*.

### **3.11 Efetividade dos isolados fúngicos para suprimir *B. cinerea* em mudas de *Eucalyptus citriodora* (3º experimento)**

Para testar a efetividade dos antagonistas na supressão de *B. cinerea* 'in vivo', utilizaram-se mudas produzidas por estaquias de *E. citriodora* em tubetes, com 60 dias, fornecidas pelo viveiro de mudas Flora Cantareira,

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados obtidos a partir de estacas, micro estacas, plantas jovens, solo e substrato de *E. grandis* foram *Aspergillus* sp., *Clasdosporium* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Pestalotia* sp., varios isolados de *Trichoderma* sp. Foi realizado teste preliminar de pareamento de culturas, no qual o isolado de *Trichoderma* sp. clone H-18 Microjardim clonal do viveiro florestal foi o melhor agente antagonista.

Houve interação significativa entre as épocas de aplicação e a intensidade da doença (resultado do primeiro experimento).

Em relação às épocas de aplicação, tratamentos 24 horas antes do patógeno *B. cinerea*, os melhores resultados obtidos foram com uso de *Trichoderma* sp., Subtin (metabólitos produzidos por *B. subtilis*) e pelo fungicida tolylfluanid (tratamento padrão), com área sadia de 100,0; 100,0 e 95,94%, respectivamente. *Trichoderma* sp. igualou-se ao fungicida tolylfluanid com 100,0% de área sadia, apresentando, dessa forma, ótimo resultado. *Trichoderma* e Subtin quando aplicados simultaneamente e 24 horas após não foram eficientes, sendo estatisticamente inferiores. Esse fato foi devido ao antagonista *Trichoderma* necessitar de um período de tempo para produzir as substâncias antagonistas e ao Subtin ter, em sua composição, principalmente antibióticos, os quais também necessitam de um período para a inibição da germinação dos conídios (Bettiol et al., 1992). Von Stowasser (1996) obteve resultado semelhante com *Trichoderma* em discos de folhas de *Eucalyptus* sp., pois o mesmo controlou *B. cinerea*. Metabólitos produzidos por *B. subtilis* (Subtin) inibiram a germinação de uredosporos de *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus*, agente etiológico da ferrugem do feijão (Bettiol et al., 1992), e uredosporos de *Hemileia vastatrix*, agente

etiológico da ferrugem do cafeeiro (Bettiol et al., 1994). A sensibilidade de *B. cinerea* ao fungicida tolylfluand foi relatada por Yamashita et al. (1997) e Kimura (1999) inibindo o crescimento micelial do fungo *Botrytis cinerea* *in vitro*.

*Saccharomyces cerevisiae* destacou-se estatisticamente em relação aos demais agentes de biocontrole na aplicação 24 horas após ao patógeno *B. cinerea*, sendo estatisticamente superior à aplicação simultânea e ao fungicida (Tabela 1). Esse fato provavelmente é devido a *S. cerevisiae* parasitar diretamente o micélio de *B. cinerea* (Piccinin, 1995). Nesse caso, a existência de algum efeito via controle biológico provavelmente seria devida a metabólitos produzidos pela levedura, pois a competição por nutriente e espaço em tempo tão curto seria inviável.

Houve interação significativa entre as épocas de aplicação e os tratamentos para a porcentagem de recuperação do *B. cinerea*.

O Subtin (metabólitos produzidos por *B. subtilis*) destacou-se na época de aplicação com 24 horas antes da aplicação do *B. cinerea* em reduzir a área foliar lesionada, igualou-se estatisticamente à testemunha e ao *B. subtilis* quanto à recuperação de *B. cinerea*, inclusive nos três períodos de aplicação (Tabela 2). Esse fato pode demonstrar a capacidade fungistática e não fungicida dos tratamentos. A suspensão da aplicação desses tratamentos poderia levar, em condições ambientais favoráveis, ao novo aumento na taxa de progresso da doença, pois os esporos permanecem viáveis. O *C. rosea* e o tolylfluand foram superiores aos demais agentes de biocontrole e apresentaram baixa recuperação do patógeno 24 horas antes. Os tratamentos aplicados 24 horas após não diferiram estatisticamente da testemunha quanto à recuperação de *B. cinerea*, inclusive com aplicação do fungicida.

Não há dados de literatura para que se possa discutir mais detalhadamente os resultados obtidos em relação à recuperação do patógeno *Botrytis cinerea*.

TABELA 1. Porcentagem de área lesionada no 10<sup>o</sup> dia de avaliação, em discos de folhas de *Eucalyptus grandis* inoculados com *Botrytis cinerea* nos tratamentos com antagonistas *in vitro*. UFLA: Lavras-MG, 2000.

Tratamentos	Épocas de aplicação		
	24h antes	Simultâneo	24h depois
Testemunha	57,68 d A	45,31 c B	63,56 b A
Tolyfluanid	0,00 a A	0,00 a A	11,43 a A
<i>Bacillus subtilis</i>	25,43 b B	55,18 c A	57,31 b A
Subtin	4,06 a B	52,06 c A	53,18 b A
<i>Trichoderma</i> sp.	0,00 a C	42,18 c B	57,25 b A
<i>Clonostachys rosea</i>	12,43 b B	15,12 b B	61,43 b A
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41,68 c A	11,93 b B	8,81 a B

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (1974) ao nível de 1% de probabilidade. Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (1974) ao nível de 1% de probabilidade.

No segundo experimento, para avaliar a melhor época de aplicação *B. cinerea* houve interação significativa entre as épocas de aplicações 24, 48 e 72 horas e os tratamentos com relação à porcentagem de área foliar lesionada no 10<sup>o</sup> dia após a aplicação do patógeno.

Os tratamentos com *Clonostachys rosea* e tolyfluanid, aplicados 24 horas antes do *B. cinerea*, foram estatisticamente iguais e superiores aos demais tanto em relação aos agentes de biocontrole quanto às épocas de

aplicação, sem área lesionada de 96,38 e 100,0 %, respectivamente (Tabela 3). *Trichoderma* sp. também apresentou bons resultados quando aplicado 24, 48 e 72 horas, não diferindo quanto a épocas, porém sendo inferior ao *C. rosea* e tolylfluaniid 24 horas antes.

TABELA 2. Porcentagem de recuperação de *Botrytis cinerea* em placas de Petri no 10<sup>o</sup> dia de avaliação, em discos de folhas de *Eucalyptus grandis* após os tratamentos com antagonistas *in vitro*. UFLA: Lavras-MG, 2000.

Tratamentos	Épocas de aplicação		
	24 h. antes	Simultâneo	24h. depois
Testemunha	100,00 c A	100,00 c A	100,00 a A
Tolylfluaniid	12,49 a A	35,41a B	79,16 a C
<i>Bacillus subtilis</i>	87,50 c A	85,41 c A	100,00 a A
Subtin	87,50 c A	100,00 c A	100,00 a A
<i>Trichoderma</i> sp.	27,08 b A	85,41c B	100,00 a B
<i>Clonostachys rosea</i>	6,24 a A	100,00 c B	93,74 a B
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35,41b A	62,49 b B	95,83 a C

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (1974) ao nível de 1% de probabilidade.

Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (1974) ao nível de 1% de probabilidade.

*S. cerevisiae* igualou-se a *C. rosea* e *Trichoderma* sp. e ao tolylfluaniid quando aplicado 72 horas antes. Em relação às épocas, não diferiu de 48 horas antes. Esse tempo pode ser necessário para maior crescimento da levedura para tornar-se competitivo com o patógeno (Tabela 3).

Sutton e Peng (1993) haviam constatado que o *Gliocladium roseum* Bainier, hoje classificado como *Clonostachys rosea*, isolado do filoplano de morangueiro inoculado em plantas em casa-de-vegetação, reduziu em 97 a 100% a esporulação de *B. cinerea* em folhas senescentes de morangueiro. Os mesmos autores observaram no campo, durante a estação de crescimento, que a redução foi de 81 a 100%. Sutton (1994) relatou que *G. roseum* compete com o crescimento saprofítico do patógeno, impede a colonização endofítica dos tecidos senescentes e, conseqüentemente, a sua esporulação. Segundo o autor, o antagonista foi mais competitivo se presente antes do patógeno infectar ou concomitante ao patógeno. Tatagiba (1996) confirmou esses resultados, demonstrando ótimo nível de controle com o antagonista *G. roseum* e proporcionou reduções até 100% na esporulação de *B. cinerea* em restos culturais de roseira

Para a porcentagem de recuperação de *B. cinerea* em placas de Petri no experimento pulverizado com agentes de biocontrole 24, 48 e 72 horas antes de *B. cinerea*, houve interação entre as épocas de aplicação e os tratamentos testados.

*S. cerevisiae*, *subtin*, *B. subtilis* e a testemunha não diferiram estatisticamente 24 horas antes da aplicação, não afetaram o crescimento do patógeno, inclusive em todas as épocas, com exceção de *S. cerevisiae*, o qual apresentou menor recuperação 48 e 72 horas antes.

A menor porcentagem de recuperação de *B. cinerea* em placas após 10 dias foi nos tratamentos 72 horas e 48 horas antes da aplicação do patógeno. A recuperação de *B. cinerea* nos tratamentos alternativos aplicados 48 horas antes do patógeno foi menor para toylfluanid, *C. rosea* e *Trichoderma*, 0,0; 1,06 e 4,75%, respectivamente (Tabela 4). Quando a aplicação dos tratamentos alternativos foi feita 72 horas antes da aplicação do *B. cinerea*, observou-se que a recuperação do patógeno foi de 8,33 quando

se utilizou *C. rosea*, e 0,0% quando se utilizou *Trichoderma* sp., os quais foram iguais estatisticamente ao fungicida tolylfluanid, que permitiu recuperação de 10,93%.

TABELA 3. Porcentagem da área lesionada no 10<sup>o</sup> dia de avaliação, em discos de folhas de *Eucalyptus grandis* inoculados com *Botrytis cinerea* nos tratamentos com antagonista *in vitro* aplicados 24, 48 e 72 horas antes do patógeno. UFLA: Lavras-MG, 2000.

Tratamentos	Época de aplicação		
	24 h. antes	48 h. antes	72 h. antes
Testemunha	51,56 c C	40,62 d B	27,00 b A
Tolylfluanid	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A
<i>Bacillus subtilis</i>	45,87 c B	41,68 d B	29,12 b A
Subtin	16,18 b A	22,93 c A	37,43 b B
<i>Trichoderma</i> sp.	10,93 b A	4,75 a A	5,56 a A
<i>Clonostachys rosea</i>	3,62 a A	1,06 a A	2,56 a A
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41,56 c B	15,37 b A	8,81 a A

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (1974) ao nível de 1% de probabilidade. Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (1974) ao nível de 1% de probabilidade.

Houve diferença significativa entre as épocas de aplicação do antagonista, no terceiro experimento com mudas de *Eucalyptus cidriodora*, para as variáveis: i- Notas da doença; ii- Número de folhas totais (NFT); e iii- Número de folhas com sintomas. A aplicação simultânea com *B. cinerea* originou menor intensidade da doença e número de folhas com sintomas, resultando, conseqüentemente, em maior número de folhas para todos os



tratamentos (Tabela 5). Os resultados diferem do experimento *in vitro*, provavelmente devido à média da temperatura do experimento não ser ideal para *B. cinerea*. Durante o experimento, a média da umidade relativa foi de 97%, ideal para o patógeno, porém a temperatura variou entre  $26 \pm 2$  °C, considerada alta para a germinação dos conídios. A temperatura ideal para a germinação e esporulação do *B. cinerea* varia entre  $20 \pm 4$  °C (Souza, 1991).

TABELA 4. Porcentagem de recuperação de *Botrytis cinerea* em placas de Petri no 10<sup>o</sup> dia de avaliação, em discos de folhas de *Eucalyptus grandis* após os tratamentos com antagonistas *in vitro*. UFLA: Lavras-MG, 2000.

Tratamentos	Épocas de aplicação		
	24h. antes	48 h. antes	72h. antes
Testemunha	100,00 d A	97,91 c A	97,91 d A
Tolyfluanid	8,33 a A	0,00 a A	10,41 a A
<i>Bacillus subtilis</i>	95,83 d A	91,66 c A	85,41 c A
Subtin	100,00 d A	95,83 c A	100,00 d A
<i>Trichoderma</i> sp.	37,49 c C	14,58 a B	0,00 a A
<i>Clonostachys rosea</i>	22,91 b B	10,41 a A	8,33 a A
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	95,83 d B	62,49 b A	58,33 b A

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (1974) ao nível de 1% de probabilidade.

Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (1974) ao nível de 1% de probabilidade.

Houve diferença significativa para a média de número de folhas com sintomas (NFCS) entre os agentes de biocontrole. *S. cerevisiae* apresentou maior (NFCS), sendo este diferente estatisticamente da testemunha e dos demais tratamentos (Tabela 6).

TABELA 5. Médias do número de folhas com sintomas (NFCS), área abaixo da curva de progresso de notas e número de folhas totais (NFT) do patógeno *Botrytis cinerea* inoculados em mudas de *Eucalyptus citriodora* em diferentes períodos de inoculação. Lavras-MG, 2.000.

Tratamentos	Notas	Número de folhas	
		Totais	C/sintomas
Trat. 48h antes do <i>B. cinerea</i>	17,74 b	30,60 a	23,29 b
Trat. 24h antes do <i>B. cinerea</i>	17,66 b	32,63 b	23,58 b
Trat. simultâneo c/ <i>B. cinerea</i>	15,09 a	31,89 b	17,27 a

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (1974) ao nível de 1% de probabilidade.

Estudos são necessários para determinar o papel do mecanismo de antagonismo de *Trichoderma* sp. H-18, *C. rosea*, *Bacillus subtilis*, Subtin, *Saccharomyces cerevisiae* e tolylfluanid em mudas de *Eucalyptus citriodora* pelo patógeno *Botrytis cinerea*.

Novos estudos, em viveiro comercial de *Eucalyptus* sp., devem ser conduzidos visando determinar a época, o modo, a frequência e a dosagem de aplicação dos antagonistas, bem com sua integração com outras medidas de manejo do mofo cinzento.

**TABELA 6: Médias do número de folhas com sintomas (NFCS) da inoculação de *Botrytis cinerea* em mudas de *Eucalyptus citriodora* nos tratamentos testados. UFLA: Lavras-MG,2000.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Médias (NFCS)</b>
<b>Tolyfluanid</b>	<b>18,42 b</b>
<b><i>Clonostachys rosea</i></b>	<b>18,58 b</b>
<b><i>Bacillus subtilis</i></b>	<b>20,28 b</b>
<b>Testemunha absoluta</b>	<b>20,32 b</b>
<b>Testemunha relativa</b>	<b>20,91 b</b>
<b>Subtin</b>	<b>22,22 b</b>
<b><i>Trichoderma</i> sp</b>	<b>23,13 b</b>
<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	<b>27,13 a</b>

**Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (1974) ao nível de 1% de probabilidade**

## 5 CONCLUSÕES

a) O período ideal para aplicação dos tratamentos antagonistas é 24 horas antes do patógeno *Botrytis cinerea*;

b) *Trichoderma* sp. H-18 é um eficiente competidor com *B. cinerea*, em discos de folhas de *Eucalyptus grandis*, obtendo 100% de controle do patógeno;

c) Subtin (metabólitos produzidos por *Bacillus subtilis*) age eficientemente por antibiose (produção de antibióticos);

d) O fungicida tolylfluanid proporcionou 100% do controle do patógeno *B. cinerea* em discos de folhas destacadas de *E. grandis*;

e) *Clonostachys rosea* tem grande potencial para o biocontrole de *B. cinerea*, reduzindo a esporulação do patógeno em discos de folhas de *E. grandis* e em mudas de *E. citriodora*;

f) A levedura *Sacchomyces cerevisiae*, constituída pelo "Fermento Biológico Fleischmann" (Fermento de padaria), demonstrou controle de 91% na redução da severidade da doença em discos de folhas de *Eucalyptus grandis* inoculadas 24 horas após a inoculação do *Botrytis cinerea*.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. San Diego: Academic Press, 1997. 803p.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4. ed. New York: John wiley sons, 1995. 869p.

ANDREI, E. **Compêndio de defensivos agrícolas- Guia Prático de Produtos Fitossanitários Para Uso Agrícola**. 6. ed. São Paulo-SP: Organização Andrei, 1999.

BAKER, K. F.; COOK. R. J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: W. H. Freeman, 1974. 433p.

BLAKEMAN, J. P.; FOKKEMA, N. J. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, 1982. v. 2, p.363-376.

BELANGER, R. R.; DUFOUR, N.; CARON, J.; BENHAMOU, N. Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism. **Biocontrol Science and Technology**, Quebec, v.5, n. 1, p. 41-53, 1995.

BETTIOL, W. Biocontrole na filósfera: problemas e perspectivas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo-RS, v. 5, p. 59-97, 1997.

BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas, In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúma, SP: EMBRAPA-CNPMA, 1991. Cap.1, p. 1-5.

BETTIOL, W. Seleção de microrganismos antagônicos à *Pyricularia oryzae* Cav. para o controle da brusone do arroz (*Oryza sativa* L. ). 1988. 140p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP.

BETTIOL, W.; AUER, C. G.; CAMARGO, L. E. A.; KIMATI, H. Controle da mancha foliar de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* induzida por *Cylindrocladium scoparium* com *Bacillus* sp. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, SP, v. 14, n. 3/4, p. 210-218, jul./dez. 1988.

BETTIOL, W.; BRANDÃO, M. S. B.; SAITO, M. L. Controle da ferrugem do feijoeiro com extratos e células formuladas de *Bacillus subtilis*. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, SP, v. 18, n. 2, p. 153-159, abr./jun. 1992.

BETTIOL, W.; SAITO, M. L.; BRANDÃO, M. S. B. Controle da ferrugem do cafeeiro com produtos à base de *Bacillus subtilis*. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, SP, v. 20, n. 2, p. 119-122, abr./jun. 1994.

BLAKEMAN, J. P.; FOKKEMA, N. J. Potential for biological control of plant diseases on the phyllplane. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 20, p. 167-192, 1982.

CALDARI JÚNIOR, P. Caracterização morfológica, esporulação e sensibilidade a fungicidas de isolados de *Botrytis cinerea* de flores e plantas ornamentais. 1998. 51p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP.

CHET, I. Application, mode of action and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: CHET, I. (Ed.) **Innovative approaches to plant disease control**. New York: Wiley, 1987. p.137-160.

COOK, R. J. Biological control of the pathogens: theory to application. **Phytopathology**, St. Paul, v. 75. n. 1, p. 25-29, 1985.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**, St. Paul: APS Press, 1983. 539p.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic Plant Pathology Methods**. Boca Raton: CRC Press, 1985. 355p.

DUBOS, B. Biocontrol of *Botrytis cinerea* on grapevines by an antagonistic strain of *Trichoderma harzianum*. In: KLUB, M. J.; REBBY, C. C. (Eds ). **Current perspectives in microbial ecology**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1984. p.370-37.

DUBOS, B. Fungal antagonism in aerial agrobiocenoses. In: CHET, I. (Ed.) **"Innovative Approaches to Plant Disease Control"**, New York: J. Wiley & Sons, **Biological Control of Plant Diseases**. New York. 1987. p.107-135.

ELAD, Y.; COHEN, A. Biological control and combination of the biocontrol agent *Trichoderma* with fungicides for the control of grey mold. In: **INTERNACIONAL TRICHODERMA AND GLIOCLADIUM WORKSHOP**, 4. , 1991, Belgrade, Itália. p. 148.

FERREIRA, D.F. Análise estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: **REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA**, 45., 2000, São Carlos, SP. **Anais...**São Carlos: Sociedade Internacional de Biometria, 2000. p.255-258.

FERREIRA, F. A. Control of eucalyptus nursery diseases in Brasil, In: PERRIN, R.; SURTHERLANO, J. R. (Eds ). **Disease and insects in forest nurseries**. Paris: INRA, 1994. p. 315-320.

FERREIRA, F. A. Doenças do Eucalipto. In: FERREIRA, F. A. **Patologia florestal - principais doenças florestais no Brasil**, Viçosa, MG: UFV. Editora Folha de Viçosa, 1989. 570p.

FERREIRA, F. A. Enfermidades do Eucalipto no Brasil. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 186, p. 5-19, 1997a.

FERREIRA, F. A. Eucalipto (*Eucalyptus* spp) - Controle de Doenças. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Eds). **Controle de doenças de plantas - grandes culturas**. Viçosa-MG: Editora UFV, 1997b, v.1, p.289-333.

FOKKEMA, N. J.; DEN HOUTER, J. G.; KOSTERMAN, Y. J. C.; NELIS, AL. Manipulation of yeasts on fields-grown wheat leaves and their antagonistic effect on *Cochliobolus sativus* and *Septoria nodorum*. *Transactions of British Mycological Society, Cambridge*, v. 72, n. 1, p. 19-29, Feb. 1979.

GHINI, R. Caracterização morfológica, serológica e patogênica de espécies de *Botrytis* que ocorrem na cultura da cebola (*Allium cepa* L.). 1984. 53p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP.

GHINI, R. Ocorrência e adaptabilidade de linhagens de *Botrytis cinerea*, no Estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira, Brasília*, v. 21, n. 2, p. 285-288, jun. 1996.

GHINI, R.; KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas. Jaguariúna, SP: EMBRAPA-CNPMA/EMOPI, 2000. 78p.

GHINI, R.; KRUGNER, T. L. Ocorrência de *Botrytis cinerea* resistente a benomil em viveiro de *Eucalyptus viminalis* em Três Barras, Sc. *Summa Phytopathologica, Piracicaba*, v. 13, n. 1-2, 1987, CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 10., 1987, Piracicaba, SP. *Resumo...* Piracicaba: SPF, 1987. p.36.

GOTTLIEB, D.; SHAW, P. D. Mechanisms of action of antifungal antibiotics. *Annual Review of Phytopathology, Palo Alto*, v. 8, p. 371-402, 1970.

GULLINO, M. L. Chemical control of *Botrytis* spp. In: VERHOEFF, K.; MALATHRAKIS, N. E.; WILLIAMSON, E. B. (Eds). *Recent advances in Botrytis research*. Wageningen: PUDOC, 1992. p. 217-222.

HAWKSWORTH, D. L.; KIRK, P. M.; SUTTON, B. C.; PEGLER, D. N. *Dictionary of the fungi*. 8. ed. Cambridge: University Press, 1995. 616p.

HENIS, Y.; CHET, I. Microbiological control of plant pathogens. *Advances in Applied Microbiology, Madison*, v. 19, p. 85-111, 1975.



ILLIPRONTI JUNIOR, R. A. Efeitos antagônicos de fungos procedentes da região do alto paranaíba-MG, em relação a *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB. ) de Bary, em soja (*Glycine max* (L. ) Merrill) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L. ) 1991. 70p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras-MG.

JARVIS, W. R. Taxonomy. In: COLEY-SMITH, J. R.; VERHOEFF, K. ; JAVIS, W. R. *The biology of Botrytis*, New York: Academic Press, 1980. p.1-18.

KIMURA, M. K. Sensibilidade e resistência *in vitro* de *Botrytis cinerea* a fungicidas. 1999. 131p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

KRUGNER, T. L.; BACCHI, L. M. A. Fungos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORI, L. (Eds). *Manual de Fitopatologia*, São Paulo: Editora Agrônômica Ceres, 1995. v. 1, p. 46-95.

LOPES, A. M. Q. Controle alternativo de antracnose causada por *Colletotrichum graminicola* (Ces) Wills em sorgo (*Sorghum bicolor* L. (Moench)). 1991, 203p. Dissertação (Mestrado) Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Rio Claro, SP.

MALATHRAKIS, N. E. Resistance of *Botrytis cinerea* to dichlofluanid in greenhouse vegetables. *Plant Disease*, St. Paul, v. 73, n. 2, p. 138-141, Feb. 1989

MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP)*, Passo Fundo, v. 4, p. 261-295, 1996.

MONTEIRO, A. J. A. Avaliação da remoção de restos culturais e de fungicidas na intensidade do mofo cinzento em roseiras cultivadas em casas de vegetação. 1996. 49p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MORANDI, M. A. B. *Gliocladium roseum* como agente de biocontrole de *Botrytis cinerea* em roseiras cultivadas em casa de vegetação. 1997. 60p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MORANDI, M. A. B.; SUTTON, J. C.; MAFFIA, L. A. Effects of host factors on development of *Gliocladium roseum* and control of *Botrytis cinerea* in rose. *European Journal of Plant Pathology*, Guelph, v. 106, n. 5, p. 439-448, 2000.

PENG, G.; SUTTON, J. C. Biological methods to control grey mould of strawberry. In: BRIGHTON CROP PROTECTION CONFERENCE PESTS DISEASES, 3., 1990, Farnham. *Proceedings...* Farnham: British Crop Protection Council, 1990. p. 233-240.

PENG, G.; SUTTON, J. C. Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Guelph, v. 13, n. 3, p. 247-257, 1991.

PENG, G.; SUTTON, J. C.; KEVAN, P. G. Effectiveness of honey bees for applying the biocontrol agent *Gliocladium roseum* to strawberry flowers to suppress *Botrytis cinerea*. *Canadian Journal Plant Pathology*, Guelph, v. 14, n. 2, p. 117-129, 1992.

PHAFF, H. J.; STARMER, W. T. Yeasts associated with plants, insects and soil. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (Eds). *The yeasts: biology of yeasts*. London: Academic Press, 1987. v. 1, cap. 6, p. 123-180.

PICCININ, E. Uso de *Saccharomyces cerevisiae* na proteção de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*), Maracujá azedo amarelo (*Passiflora edulis*) e eucalipto (*Eucalyptus spp*) contra fitopatógenos fúngicos e bacterianos. 1995, 170p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP.

REWAL, N.; COLEY-SMITH, J. R.; SEALY-LEWIS, H. M. Studies on resistance to dichlofluanid and other fungicides in *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology*, Oxford, v. 40, p. 554-560, Dec. 1991.

RONCATTO, M. C. Atividade de peroxidases, quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases e alterações no perfil eletroforético de peroxidases em milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*) tratados com *Saccharomyces cerevisiae*. 1997. 108p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

SAMOUCHA, Y.; COHEN, Y. Synergistic interaction of cymoxanil mixtures in the control of metalaxyl - resistant *Phytophthora infestans* of potato. *Phytopathology*, St. Paul, v. 78, n. 6, p. 636-640, June 1988.

SAMOUCHA, Y.; GISI, U. Use of two and three - way mixtures to prevent buildup of resistance to phenylamide fungicides against *Phytophthora* and *Plasmopora*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 77, n. 10, p. 1405-1409, Oct. 1987.

SANDER, P. L.; HOUSER, W. J.; PARISH, P. J.; COLE Jr, H. Reduced - rate fungicide mixtures to delay fungicides resistance and to control selected turfgrass diseases. *Plant Disease*, St. Paul, v. 69, n. 8, p. 939-943, Aug. 1985.

SCHROES, H-J.; SAMUELS, G. J.; SEIFERT, K. A.; GAMS, W. Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. *Mycologia*, New York, v.91, n.2, p. 365-385, 1999.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, Wahington, v. 30, p. 507-512, Sept. 1974.

SIQUEIRA FRANCO, D. A. de Controle do bolor verde (*Penicillium digitatum*) em pós-colheita de citros com produtos alternativos. 1999, 103p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Faculdade de Ciências Agrônômicas Campus de Botucatu, Botucatu SP.

SNEATH, P. H. Endospore-forming Gram-Positive rods and cocci. In: SNEATH, P. H.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. (Eds). **Bergey's Manual of systematic bacteriology**, Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. v. 2, p.1104-1207.

SOUZA, M. G. Etiologia e controle do tombamento de mudas de eucalipto, causado por *Botrytis cinerea*, no estádio de fechamento de canteiros. 1991. 53p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) Universidade Federal de Viçosa- Viçosa, MG.

SOUZA, M. G.; FERREIRA, F. A. Suscetibilidade de folhas mortas, senescentes e normais e de porções basais e superiores de hastes de mudas de *Eucalyptus grandis* a *Botrytis cinerea*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 2, p. 128, 1990.

SUTTON, J. C. Biological control of strawberry diseases. **Advances in Strawberry Research**, v. 13, p. 1-12, 1994.


SUTTON, J. C. Evaluation of microorganisms for biocontrol: *Botrytis cinerea* and strawberry, a case study. **Advances in Plant Pathology**, v. 2. p. 173-190, 1995.

SUTTON, J. C.; LI, de W.; PENG, G.; YU, H.; ZHUANG, P. A versatile adversary of *Botrytis cinerea* in Crops. **Plant Disease**, Guelph, v. 81, n. 4, p. 316-328, 1997.

SUTTON, J. C.; PENG, G. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. **Phytopathology**, St Paul, v. 83, n. 6, p. 615-621, 1993.

TATAGIBA, J. S. Avaliação de microrganismos para o controle biológico de *Botrytis cinerea* em roseira. 1996. 58p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

TATAGIBA, J. S.; MAFFIA, L. A.; MONTEIRO, A. J. A.; BARRETO, R. W. ; ALFENAS, A. C. Controle Biológico de *Botrytis cinerea* em restos culturais de Roseira. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 376, ago. 1995. CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 28. , 1995, Ilhéus, BA. Anais... Ilhéus: SBF, 1995.



TORRES, G. Madeira de Eucalipto: novas perspectivas de usos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, MG, v. 18, n. 186, p. 3, 1997.

TRONSMO, A.; DENNIS, C. The use of *Trichoderma* species to control strawberry fruit rots. **Netherlands Journal Plant Pathology**, Wageningen, v. 83, p. 449-455, 1977.

TUITE, J. **Plant pathological methods: fungi and bacteria**. Minneanopolis: Burgess Publishers Company, 1969. 240p.

URQUHART, E. J.; MENZIES, J. G.; PUNJA, Z. K. Growth and biological control activity of *Tilletiopsis* species against powdery mildew (*Spaerotheca fulginea*) on greenhouse cucumber. **Phytopathology**, St. Paul. v. 84, n. 4, p. 341-351, Apr. 1994.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. Leveduras para o biocontrole de fitopatógenos. In: MELO, I. S. de. ; AZEVEDO, J. L. de. (Eds). **Controle Biológico**. Jaguariúna, Sp: EMBRAPA-CNPMA, 2000. v.3, p. 41-56.

VON STOWASSER, E. A. S. **Seleção de fungos para supressão de *Botrytis cinerea* em mudas de Eucalipto**. 1996. 32p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

WADE, M. Strategies for preventing or delaying the onset of resistance to fungicides and for managing resistance occurrences. In: DELP, C. J. (Ed) **Fungicide Resistance in North America**. 2. ed. St. Paul: APS Press, 1994. cap.1, p. 13-14.

WILLIAMSON, M. A.; FOLLEMA, N. J. Phyllosphere yeasts antagonize penetration from a pressoria and subsequent infection of maize leaves by *Colletotrichum graminicola*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 91, n. 6, p. 265-276, 1985.

WISNIEWSKI, M.; BILES, C.; DROBY, S.; MCLAUGHLIN, R.; WILSON, C.; CHALUTZ, E. Mode of action of postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii* 1. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 39, 1991, p. 245-258.

YAMASHITA, R. T.; KIMURA, M. K.; GUALBERTO, B. D.; CASTRO, H. A. ; MILANI, D.; LEITE, E. A. G.; CARDOSO, M. A. F. C. Inibição do crescimento micelial "*in vitro*" de *Botrytis* sp. , causador do mofo cinzento de estacas e micro estacas de eucalipto (*Eucalyptus* sp. ), por fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 320, 1997. CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 30., 1997, Poços de Calda. **Anais...** Poços de Caldas: SBF, 1997.

ZUANG, P. G.; SUTTON, J. C.; HOPKIN, A. Evolution of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in container-grown black spruce seedlings. **Canadian Journal of Forestry Research**, Guelph, v. 24, n. 7, p. 1312-1316, 1994.