

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA - UDESC**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DOUTORADO EM MANEJO DO SOLO**

**MARIA MARGARETH ZAMBONI PINOTTI**

**EFEITO DE ISOLADOS FÚNGICOS DE SOLO SOBRE *Botrytis cinerea***  
**NAS CULTURAS DE AMORA (*Rubus fruticosus*) FRAMBOESA (*Rubus***  
***ideaus*) E MIRTILO (*Vaccinium spp*)**

**LAGES – SC**

**2011**

**MARIA MARGARETH ZAMBONI PINOTTI**

**EFEITO DE ISOLADOS FÚNGICOS DE SOLO SOBRE *Botrytis cinerea*  
NAS CULTURAS DE AMORA (*Rubus fruticosus*) FRAMBOESA (*Rubus  
ideaus*) E MIRTILO (*Vaccinium spp*)**

Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutor no Curso de Pós-  
Graduação em Manejo do Solo da  
Universidade do Estado de Santa Catarina –  
UDESC.

Orientador: Julio Cesar Pires Santos  
Co-orientador: Osmar Klauberg Filho

**LAGES – SC**

**2011**

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária  
Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14ª Região  
(Biblioteca Setorial do CAV/UDESC)

Pinotti, Maria Margareth Zamboni  
Efeito de isolados fúngicos de solo sobre *Botrytis cinerea* nas culturas de  
amora (*Rubus fruticosus*) framboesa (*Rubus idaeus*) e mirtilo (*Vaccinium*  
spp) / Maria Margareth Zamboni Pinotti; orientador: Julio César Pires  
Santos . – Lages, 2011.  
123f.

Inclui referências.  
Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências Agroveterinárias /  
UDESC.

1. *Tricoderma* spp . 2. *Clonostachys rosea* . 3. Biocontrole .  
4. Sinergismo. 5. Fungos de solo. 6. Pequenos frutos 7. *Botrytis cinérea*.  
8. *Fusarium* sp. I. Título.

CDD – 631.46

**MARIA MARGARETH ZAMBONI PINOTTI**

**EFEITO DE ISOLADOS FÚNGICOS DE SOLO SOBRE *Botrytis cinerea*  
NAS CULTURAS DE AMORA (*Rubus fruticosus*) FRAMBOESA (*Rubus  
ideaus*) E MIRTILO (*Vaccinium spp*)**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor do curso de Pós-Graduação em Manejo do Solo da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Homologada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Banca Examinadora:**

---

**Orientador/Presidente:** Dr. Julio Cesar  
Pires Santos (UDESC/Lages - SC)

---

Dr. Luciano Colpo Gatiboni  
Coordenador Técnico do Curso de  
Mestrado em Manejo do Solo

---

**Membro:** Prof. Dr. Álvaro Luís Mafra  
(UDESC/Lages - SC)

---

Dr. Leo Rufato  
Coordenador do Programa de Pós-  
Graduação em Ciências  
Agrárias – UDESC/Lages – SC

---

**Membro:** Dr. Ricardo Lima de Castro  
(EMBRAPA TRIGO)

---

Dr. Cleimon Eduardo do Amaral Dias  
Diretor Geral do Centro de Ciências  
Agroveterinárias – UDESC/Lages - SC

---

**Membro:** Dr. Pedro Boff (EPAGRI/Lages  
- SC)

Lages, Santa Catarina  
22 de novembro de 2011

*Ao João e a Maria que trouxeram alegria  
renovada à casa da vovó*

***DEDICO.***

As verdades na ciência são como imagens em três dimensões. Basta ajustarmos o foco e elas se revelam por inteiro.

**MARGARETH PINOTTI**

## AGRADECIMENTOS

Estou escalando uma montanha!  
Cheia de arestas que machucam as mãos,  
Sangram por vezes o coração e dilaceram a alma....  
Mas estou crescendo,  
Aprendendo,  
Vivendo um momento único.  
Este é o maior legado desta minha escalada.  
Para chegar a este ponto da montanha de minha vida  
Muitos olhos passantes com brilho de mel ou de mate,  
Lançaram luz a minha alma  
A eles, agradeço:

Minha família

Pelas ausências impostas, por vezes transpostas  
Em momentos fugazes de carinho e apoio;

A todos os amigos e colegas

Que em sintonia de anseios sofreram comigo  
E na busca da luz deram-me abrigo;

Ao orientador

Pela loucura imposta dos problemas meus  
Contornou meus medos, retirando obscuros véus;

A Universidade

Pela oportunidade de caminhos abertos  
Onde poucos têm chance em futuros incertos;

Aos professores

Andarilhos da educação, presentes ou ausentes  
Que fizeram em minha mente, reflexo dos sonhos seus;

Ao Pai Maior

Que fez de mim caminhante, fortificada pela fé nos homens,  
Reverencio meu espírito e ajoelho minha alma.

OBRIGADA!

## RESUMO

PINOTTI, Maria Margareth Zamboni. **Efeito de isolados fúngicos de solo sobre *Botrytis cinerea* nas culturas de amora (*Rubus fruticosus*) framboesa (*Rubus idaeus*) e mirtilo (*Vaccinium* spp).** 2011. 123f. Tese (Doutorado em Manejo do Solo) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Lages, SC. 2011.

Os frutos de pequenos porte são atacados pelo fungo necrotrófico *Botrytis cinerea* causando o Mofo cinzento em regiões úmidas do planeta. Para minimizar prejuízos sem alterar o sabor natural dos frutos e presença de resíduos químicos, estudos de biocontrole vêm sendo conduzidos com microrganismos como os fungos microscópicos de solo que constituem inúmeras espécies antagonistas como *Trichoderma* spp e *Clonostachys rosea* ou patogênicas como *Fusarium* spp. Este trabalho objetivou o isolamento de fungos mais frequentes de solo associados a culturas de amora (*Rubus* sp), framboesa (*Rubus idaeus*) e mirtilo (*Vaccinium* spp) em manejo integrado e convencional, em Latossolo bruno, na região de Vacaria, situada no nordeste do Rio Grande do Sul, Brasil e utilizados em testes de biocontrole e sinergismo. Os isolados M1 e M8 que apresentaram colônia de cor rosada foram submetidos a análise morfológica e genética sendo utilizados em testes de antagonismo à *B. cinerea* bem como os conhecidos antagonistas a este patógeno *Trichoderma* spp e *C. rosea* co-inoculados avaliando sinergismo no biocontrole exercido à campo. Os experimentos conduzidos em parcelas de cinco plantas para cada tratamento e cultura de pomares comerciais instalados em Vacaria, Rio Grande do Sul, Brasil, consistiram na inoculação por aspersão  $10^6$  conídios/mL de M1, M8, *C. rosea* isolado GFO4 (EMBRAPA) e *Trichoderma* spp. bem como a co-inoculados *C. rosea* e *Trichoderma* spp, duas vezes por semana durante a floração das plantas. A avaliação considerou três plantas centrais de cada cultura e tratamento, das quais foram colhidos sete frutos duas vezes semanas até o fim da colheita e avaliados no quarto dia de prateleira quanto ao aparecimento de sintomas de *B. cinerea*. Os resultados submetidos a análise de variância pelo teste DMS de Fisher, 5%, demonstraram antagonismo exercido por M1 e M8 e sinergismo no controle do mofo cinzento nos frutos co-inoculados com *Trichoderma* e *C. rosea*.

**Palavras-chave:** *T. asperellum*. *Clonostachys rosea*. Biocontrole. sinergismo. Fungos de solo. Isolamento. Pequenos frutos. *Botrytis cinerea*. *Fusarium* sp. morfologia. caracterização molecular.



## ABSTRACT

PINOTTI, Maria Margareth Zamboni. **Efeito de isolados fúngicos de solo sobre *Botrytis cinerea* nas culturas de amora (*Rubus fruticosus*) framboesa (*Rubus idaeus*) e mirtilo (*Vaccinium* spp).** 2011. 123f. Theses (Ph.D. soil management course) – Santa Catarina State University. Post Graduation Program in Agriculture Science, Lages, SC. 2011.

The small-sized fruits are attacked by the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* causing gray mold in humid regions of the planet. To minimize losses without changing the natural flavor of fruits and chemical residues, biocontrol studies have been conducted with microscopic organisms like fungi of soil that are antagonistic to many species and *Trichoderma* spp *Clonostachys rosea* or pathogens such as *Fusarium* spp. This work aimed the isolation of soil fungi frequently associated with cultures of blackberry (*Rubus* sp), raspberry (*Rubus idaeus*) and blueberry (*Vaccinium* spp) in an integrated and conventional in Oxisol, in Vacaria, located in the northeast Rio Grande do Sul, Brazil and used in biocontrol tests and synergism. Isolates M1 and M8 colony that had pink underwent morphological and genetic tests being used in antagonism to *B. cinerea* and the known antagonistic to the pathogen, and *Trichoderma* spp *C. rosea* co-inoculated biocontrol exercised in evaluating the synergism field. The experiments conducted in plots of five plants for each treatment and culture of commercial orchards in Vacaria installed, Rio Grande do Sul, Brazil, consisted of inoculation by spraying  $10^6$  conidia / ml of M1, M8, *C. rosea* isolated GFO4 (EMBRAPA) and *Trichoderma* spp. and co-inoculated *C. rosea* *Trichoderma* spp twice a week during the flowering of plants. The evaluation has three central plants of each culture and treatment of fruits that were harvested twice seven weeks until the end of harvest and evaluated on day shelf for the appearance of symptoms of *B. cinerea*. The results submitted to analysis of variance by Fisher's LSD tests, 5% demonstrated antagonism exerted by M1 and M8 and synergism in the control of gray mold on fruits co-inoculated with *Trichoderma* and *C. rosea*.

**Keywords:** *T. asperellum*. *Clonostachys rosea*. Biocontrol. Synergism. Soil fungi. Isolation. small fruits. *Botrytis cinerea*. *Fusarium* sp. Morphology. Molecular characterization.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fases de desenvolvimento de amora e fontes iniciais de infecção. ....	29
Figura 2 - Colonização de hifas em conídios e tubos germinativos de <i>B. cinerea</i> (BC) de <i>C. rosea</i> (ex <i>G. roseum</i> ) (GR). É possível observar as penetrações de hifas em conídios (Figura 4A, B, seta para a esquerda) e em tubos germinativos (4A, B, seta para a direita) de <i>B. cinerea</i> (LI <i>et al.</i> , 2002; HUNG <i>et.al.</i> , 2002).....	30
Figura 3 - Microscopia eletrônica mostrando hifas finas de <i>C. rosea</i> (A) parasitando hifas de <i>B. cinerea</i> (B) (VALDEBENITO-SANHUEZA, 1997 a).....	32
Figura 4 - Pontos de coleta de solo para isolamento de fungos mais frequentes em solos com culturas de amora, framboesa e mirtilo. ....	54
Figura 5 - Mirtileiros estabelecidos em casa de vegetação. ....	72
Figura 6 - Micoparasitismo do isolado M3 sobre o fitopatógeno <i>B. cinerea</i> . ....	78
Figura 7 - Micoparasitismo do isolado M8 sobre o fitopatógeno <i>B. cinerea</i> . ....	79
Figura 8 - Gel da extração e quantificação do DNA genômico extraído de isolados A1 de solo de amoreira, M3 e M8 de solo de framboeseiro e GFO4 de tecidos de morangueiro com o marcador Lambda. ....	102
Figura 9 - Árvore filogenética construída pelo software Mega 3.1 a partir de sequências da região ITS1-5,8S e ITS2 do rDNA de biótipos de isolados fúngicos utilizando o método <i>Neighbor-Joining</i> e utilizando como <i>outgroup</i> a sequência do biótipo de <i>Cucumis</i> sp. obtida no <i>GenBank</i> . ....	102

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sobrevivência do patógeno ou do antagonista em cultura pareada avaliada pela zona de inibição (%). .....	77
Quadro 2 - Capacidade antagônica a <i>B. cinerea</i> dos antagônicos candidatos isolados em cultura pareada medida pela escala de classes de <i>Bell et. al.</i> (1982).....	77
Quadro 3 - Dados obtidos pelo INMET na 17 <sup>a</sup> hora do dia, momento da colheita dos frutos.	83
Quadro 4 - Análise de confrontação das sequências obtidas com as do banco de dados do <i>GenBank</i> , por meio do <i>Blastn</i> com a espécie de maior score. ....	103

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de frutos de amoreira, framboeseiro e mirtilheiro com sintomas de <i>B. cinerea</i> em relação ao número total de frutos colhidos após tratamentos realizados com <i>Clonostachys rosea</i> (isolado GFO4) e <i>Trichoderma asperellum</i> . ....	44
Tabela 2 - Caracterização química dos solos em estudo com culturas estabelecidas de amora, framboesa e mirtilo. ....	57
Tabela 3 - Total das quatro avaliações de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de fungos isolados de solo próximo a culturas de amora, framboesa e mirtilo e pH destes solos: ....	57
Tabela 4 - Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de fungos isolados de solo próximo a culturas de amora, framboesa e mirtilo em quatro datas de coleta:.....	58
Tabela 5 - Discos de folhas de amoreira, framboeseiro e mirtilheiro colonizados por fungos candidatos antagonistas e o isolado GFO4 em tratamentos preventivos em casa de vegetação.....	80
Tabela 6 - Análise da variável porcentagem de discos de folhas de amoreira, framboeseiro e mirtilheiro colonizados com <i>Botrytis cinerea</i> após os tratamentos preventivos aplicado em casa de vegetação. ....	81
Tabela 7 - Número de frutos de amoreira com sintomas de <i>B. cinerea</i> em cada data colheita para cada tratamento. ....	84
Tabela 8 - Número de frutos de framboeseiro com sintomas de <i>B. cinerea</i> em cada semana de colheita para cada tratamento. ....	84
Tabela 9 - Número de frutos de mirtilheiro com sintomas de <i>B. cinerea</i> em cada semana de colheita para cada tratamento. ....	85
Tabela 10 - Média do crescimento do diâmetro das colônias dos isolados candidatos, comparadas a obtida pelo isolado GFO4 de <i>C. rosea</i> . ....	100

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Comportamento do fungo <i>Aspergillus</i> sp. em cada época e local de coleta. ....	59
Gráfico 2 - Comportamento do fungo <i>Penicillium</i> sp. em cada época e local de coleta. ....	60
Gráfico 3 - Presença de colônias de fungos candidatos do tipo <i>Clonostachys</i> em cada época e local de coleta. ....	60
Gráfico 4 - Comportamento do fungo <i>Trichoderma</i> sp. em cada época e local de coleta. ....	61
Gráfico 5 - Dendrograma baseado na distância euclidiana e método de agrupamento do vizinho mais distante, das áreas e épocas.....	61

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
2.1. A VISÃO DO MUNDO E A RECENTE HISTÓRIA DO CENÁRIO AGRÍCOLA.....	20
2.2. CONTROLE DE DOENÇAS EM PLANTAS.....	22
2.2.1. Controle convencional .....	22
2.2.2. Controle biológico .....	23
2.3. UMA VISÃO AGRÍCOLA: OS PEQUENOS FRUTOS .....	26
2.4. O FUNGO <i>Botrytis cinerea</i> : AGENTE CAUSADOR DO MOFO CINZENTO EM PEQUENOS FRUTOS .....	28
2.5. OS FUNGOS <i>Clonostachys rosea</i> E <i>Trichoderma</i> spp: UMA HISTÓRIA DE BIOCONTROLE.....	29
2.5.1. <i>Clonostachys rosea</i> .....	30
2.6. UMA VISÃO HOLÍSTICA: PATÓGENOS USADOS EM BIOCONTROLE .....	32
<b>3. HIPÓTESES .....</b>	<b>35</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>36</b>
<b>5. CAPÍTULO I .....</b>	<b>37</b>
<b>AVALIAÇÃO DE SINERGISMO ENTRE OS FUNGOS <i>Trichoderma asperellum</i> E A ESTIRPE GFO4 DE <i>Clonostachys rosea</i> CONTRA <i>Botrytis cinerea</i>, EM FRAMBOESA, AMORA E MIRTÍLO .....</b>	<b>37</b>
1. INTRODUÇÃO.....	39
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
2.1. INSTALAÇÃO DO EXPERIMENTO A CAMPO.....	42
2.2. APLICAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS ISOLADOS A CAMPO .....	43
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4. CONCLUSÕES .....	46
<b>6. CAPÍTULO II.....</b>	<b>47</b>
<b>ISOLAMENTO DE FUNGOS DE SOLO ASSOCIADOS AS CULTURAS DE AMORA, FRAMBOESA E MIRTILO NO SUL DO BRASIL.....</b>	<b>47</b>
1. INTRODUÇÃO.....	49
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
2.1. CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO DE AMOSTRAGEM.....	53
2.2. CARACTERIZAÇÃO DOS POMARES AMOSTRADOS .....	53

2.3.	ANÁLISES QUÍMICAS DO SOLO .....	54
2.4.	COLETA DE SOLO PARA ANÁLISE DE FUNGOS .....	54
2.5.	QUANTIFICAÇÃO DE FUNGOS E ESTATÍSTICA.....	55
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
3.1.	RESUMO DOS RESULTADOS.....	62
4.	CONCLUSÕES .....	63
<b>7.</b>	<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>64</b>
	<b>AVALIAÇÃO DE ANTAGONISMO DE FUNGOS ISOLADOS OBTIDOS EM CULTURAS DE AMOREIRA, FRAMBOESEIRA, MIRTILEIRO CONTRA <i>Botrytis cinerea</i> EM LABORATÓRIO, CASA DE VEGETAÇÃO E A CAMPO. ....</b>	<b>64</b>
1.	INTRODUÇÃO.....	66
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	69
2.1.	OBTENÇÃO E PROPAGAÇÃO DE INÓCULOS .....	69
2.1.1.	Obtenção e preparo do inóculo do patógeno .....	69
2.1.2.	Origem dos isolados candidatos a antagonistas .....	69
2.1.3.	Multiplicação dos fungos isolados e preparo dos inóculos.....	70
2.2.	ENSAIOS EM FOLHAS DESTACADAS .....	70
2.2.1.	Origem e desinfecção do material vegetal .....	70
2.2.2.	Verificação do potencial antagonista dos fungos isolados em teste de cultura pareada .....	70
2.3.	TESTE DE PATOGENICIDADE DOS ISOLADOS EM AMORA, FRAMBOESA E MIRTÍLO .....	71
2.4.	ESTUDO EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	72
2.4.1.	Instalação dos experimentos.....	72
2.4.2.	Descrição dos tratamentos.....	73
2.4.3.	Avaliação para as três culturas em casa de vegetação .....	73
2.5.	TRABALHO REALIZADO A CAMPO .....	74
2.5.1.	Origem e conservação dos isolados antagonistas .....	74
2.5.2.	Estabelecimento dos experimentos em cultivo comercial .....	75
2.5.3.	Descrição dos tratamentos e avaliação para as três culturas em cultivo comercial .....	75
2.5.4.	Análises Estatísticas.....	76
3.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	77
3.1.	ANTAGONISMO EM MEIO DE CULTURA .....	77
3.2.	ANÁLISE DE FITOPATOGENICIDADE .....	79
3.3.	ANTAGONISMO DOS ISOLADOS A <i>Botrytis cinerea</i> AVALIADO EM FOLHAS DESTACADAS DE PLANTAS SUBMETIDAS A TRATAMENTO PREVENTIVO EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	80
3.4.	BIOCONTROLE DOS ISOLADOS SOBRE <i>Botrytis cinerea</i> EM CULTURAS COMERCIAIS DE AMOREIRA, FRAMBOESEIRO E MIRTILEIRO .....	82
4.	CONCLUSÕES .....	86
<b>8.</b>	<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>88</b>
	<b>CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS ISOLADOS DA REGIÃO RIZOSFÉRICA DE AMOREIRA, FRAMBOESEIRO E MIRTILEIRO ANTAGONISTAS A <i>Botrytis cinerea</i>.....</b>	<b>88</b>
1.	INTRODUÇÃO.....	90
1.1.	O ASCOMYCOTA <i>Clonostachys rosea</i> .....	90
1.2.	<i>Fusarium oxysporum</i> .....	91

1.3.	VARIABILIDADE GENÉTICA DOS ISOLADOS POR SEQUENCIAMENTO DO DNA RIBOSSOMAL.....	92
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	95
2.1.	OBTENÇÃO DOS ISOLADOS.....	95
2.2.	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS .....	95
2.3.	ANÁLISE MOLECULAR DOS ISOLADOS .....	96
2.3.1.	Extração de DNA.....	96
2.3.2.	Amplificação das amostras do DNA .....	97
2.3.3.	Eletroforese em Gel de Agarose.....	98
2.3.4.	Sequenciamento da região ITS do rDNA .....	99
2.3.5.	Análise filogenética .....	99
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	100
3.1.	ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	100
3.2.	ANÁLISE FILOGENÉTICA .....	101
4.	CONCLUSÕES .....	104
9.	CONCLUSÕES GERAIS .....	105
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRFICAS.....	106
11.	ANEXOS .....	121



## 1. INTRODUÇÃO

O fungo necrotrófico *Botrytis cinerea* (Pers. Ex Fr. estágio perfeito=*Botryotinia fuckeliana* (de Bary) parasita de várias culturas em regiões úmidas do planeta, causa [mofo cinzento] apodrecimento de frutos em diversas fases de desenvolvimento, causando enormes perdas aos produtores. Estes, no intuito de diminuir perdas, lançam mão dos fungicidas na maioria das vezes não específicos.

Sabemos que a agricultura, pela própria natureza é anti-ecológica, com uso em larga escala de insumos agrícolas, que embora vizem o controle de pragas e microrganismos fitopatogênicos, entre outros, também podem eliminar espécies microbianas úteis e deixar resíduos no solo e nos alimentos produzidos (AZEVEDO, J.L. in MELLO & AZEVEDO, 1999).

A supressão microbiana pode favorecer o aparecimento de linhagens de patógenos resistentes ao princípio ativo dos pesticidas (DUBOS & BULIT, 1979; CAPIEAU *et al.*, 2004) ou sendo sua aplicação feita na fase de floração pode diminuir a viabilidade do pólen e a formação do fruto (KOVACH *et al.*, 2000). Entre os microrganismos fitopatogênicos controlados se encontra o causador do mofo cinzento, o que vem sendo feito por fungicidas que, em geral, não são eficientes em suprimir a esporulação de *Botrytis cinerea*, uma vez que interferem principalmente no processo de infecção e não são efetivos contra o patógeno nos restos culturais (MORANDI, 2003), podendo levar ao aumento da resistência destes, exigindo reaplicações frequentes.

As preocupações com questões ambientais e de qualidade alimentar impulsionaram nos últimos anos o interesse dos consumidores por alimentos livres de resíduos tóxicos e que possam ser consumidos *in natura* (VALDEBENITO-SANHUEZA in MELLO & AZEVEDO, 1999; ROMBALDI, *et al.*, 2007), o que não é possível com o uso indiscriminado de agrotóxicos.

Vivemos ainda o paradigma da agricultura baseada no uso de insumos químicos, a qual muitas vezes traz consequências danosas ao meio ambiente. Como alternativa ao uso de agrotóxicos para o controle de pragas e moléstias, o controle biológico é uma prática que vem sendo cada vez mais incentivada. Com ele, se pode pensar em transformações que, visando a

conservação de recursos naturais e do planeta em que vivemos, contribuam para o fortalecimento da nova era biotecnológica em formação.

Nesta ótica, vários estudos utilizando microrganismos no controle de doenças em plantas vêm sendo conduzidos como a utilização de fungos como *Trichoderma* spp. e *Clonostachys rosea* no biocontrole do mofo cinzento causado pelo fungo necrotrófico *B. cinerea*.

O fungo antagonico *Trichoderma* spp. que demonstra atividade de quitinase (BÉLENGER *et al.* 1995) e inibição do crescimento do patógeno por substâncias tóxicas voláteis produzidas (SILVA RIBEIRO, 2001), já foi testado em várias culturas sendo disponibilizados no mercado alguns produtos formulados com estas espécies.

Outro antagonico que vem se destacando no biocontrole de *B. cinerea* é o fungo *C. rosea* isolado inicialmente no Canadá por Sutton e posteriormente no Brasil, por Valdebenito-Sanhueza em culturas de morangos. Produtos à base de *C. rosea* para o controle de *B. cinerea* somente tem registro nos EUA e Canadá. No Brasil, o fungo é comercializado para o controle do mofo cinzento em morangueiro e plantas ornamentais, porém sem registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (MORANDI, 2003).

O advento da agricultura orgânica e/ou integrada impulsiona a utilização de biotecnologias como o controle biológico de doenças em plantas, o que pode se tornar uma ação transformadora na agricultura, pelo relevante papel ecológico para manutenção de um solo livre de acúmulo de resíduos químicos, desnecessários.

A grande dificuldade na área de controle de doenças em plantas tem sido a resistência em admitir novas descobertas que usam o controle biológico não como substituto, mas como ferramenta integrada para controlar doenças na agricultura. A necessidade de insumos agrícolas adequados ao manejo integrado tem ganhado ênfase nos bancos acadêmicos como forma de contribuir na preservação da terra; bem como incentivos a pesquisas com controle biológico e integrado de doenças e pragas na agricultura.

Este trabalho objetivou, portanto, a otimização e utilização de ferramentas de controle biológico na avaliação de sinergismo entre os microrganismos *C. rosea* e *T. asperellum* quando co-inoculados em pomares estabelecidos de amoras, framboesas e mirtilos, bem como no processo de isolamento de colônias nativas com colônia de cor rosa o que pode indicar presença de antraquinonas, em solos com estas culturas estabelecidas sob diferentes situações de cultivo com posterior avaliação *in vitro* e *in vivo* do efeito antagonico a *B. cinerea* dos isolados candidatos.

A utilização destes resultados virá em prol de uma nova cultura de manejo de doenças resultando em cultivos de frutas saudáveis, livres de resíduos químicos com a produção de qualidade exigida para exportação, o que certamente beneficiará o produtor, a saúde de suas terras e a saúde do consumidor, constituindo-se em mais um fator que vem engrossar as fileiras das mudanças que ora se iniciam.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### DOS PRIMÓRDIOS DA AGRICULTURA AO CONTROLE BIOLÓGICO EM PEQUENOS FRUTOS: UM POUCO DE HISTÓRIA

#### 2.1. A VISÃO DO MUNDO E A RECENTE HISTÓRIA DO CENÁRIO AGRÍCOLA

Antes de 1500 a visão do mundo dominante na Europa assim como na maioria das civilizações era agricultura baseada na utilização de insumos de origem orgânica. A estrutura científica desta visão assentava-se sobre a autoridade da Igreja e de Aristóteles, quando as investigações dos cientistas medievais apontavam desígnios subjacentes a vários fenômenos naturais sempre consideradas do mais alto significado, como questões referentes a Deus: uma visão orgânica (MELO, 1997). Esta visão orgânica mudou radicalmente nos séculos XVI e XVII, sofrendo uma ruptura epistemológica que foi substituída pela noção de mundo máquina com mudanças revolucionárias que marcaram a revolução científica, culminadas por Copérnico, Galileu, Newton e Einstein (CAPRA, 1982). A revolução científica iniciou com Nicolau Copérnico que se opôs à concepção geocêntrica de Ptolomeu e da Bíblia. Copérnico estava consciente de que sua teoria ofenderia profundamente a Igreja e sua concepção milenar, retardando por isto sua publicação de hipótese heliocêntrica até 1543 (CAPRA, 1982).

Iniciada por Galileu ocorreu uma mudança radical na ciência, sendo ele o primeiro a combinar experimentação científica, uso de uma abordagem empírica, com o uso da linguagem matemática para formular as leis por ele descobertas. Segundo Laing (1972), nada mudou mais nosso mundo nos últimos 400 anos do que a obsessão do cientista por medidas e quantificação.

Antes de Newton, duas tendências opostas orientavam a ciência de 1600: o método empírico, indutivo, representado por Bacon, e o método racional e indutivo, representado por Descartes. Newton induziu a combinação apropriada de ambos os métodos, unificando as duas tendências e desenvolveu a metodologia que a ciência natural faz uso, desde então. Seguiu-se Einstein com a teoria da relatividade, provocando uma forte ruptura em nossos conceitos de espaço e tempo, obrigando-nos a abandonar idéias clássicas de tempo absoluto.

Ora, espaço e tempo são determinantes para registros científicos, logo tiveram de ser reestruturados com a visão de Energia Einsteiniana (CAPRA, 1982).

Por volta de 1798 a humanidade atingiu a marca de um bilhão de pessoas. Nesta época o crescimento da população mundial se dava em progressão geométrica, enquanto a dos alimentos aumentava aritmeticamente o que deveria ocasionar em longo prazo um saldo negativo de alimentos, determinando fome (MALTHUS, 1798 *in* Henriques, 2007). A visão passa então, de civilização eminentemente sedentária e agrícola para outra de produção em massa, principalmente na Europa (MELO, 1997). O primeiro grande ciclo, o Agrícola, levou um pouco mais de 900 anos imperando como tal; o segundo, o industrial, cerca de três séculos e agora, em pouco mais de 40 anos uma nova revolução vem acontecendo, pelas tecnologias constante e rapidamente desenvolvidas. Para muitos estudiosos esta época de Revolução Industrial, deveria marcar um novo período geológico: A Era dos Humanos ou período Antropoceno. Desde então a ação humana sobre o planeta tem sido extrema e de desenvolvimento acelerado, cujos efeitos se estenderam, neste modelo, até por volta de 1955 (MELO, 1997).

A Revolução Verde que ocorreu entre os anos 1940 e 1970, com a mecanização rural, irrigação, uso de fertilizantes e inseticidas, bem como a seleção de sementes mais produtivas, triplicaram a produção de grãos no Primeiro Mundo (MOON, 2011). O impacto da humanidade sobre o planeta, que iniciou um crescimento acelerado há 10 mil anos com a descoberta de procedimentos agrícolas e o aumento na produção de grãos era regulado pela alta taxa de mortalidade por epidemias e guerras. Estamos na era dos antibióticos iniciada com as descobertas de Fleming em 1927 que aumentam a perspectiva de vida, acelerando o crescimento da humanidade. Segundo as Nações Unidas, em novembro de 2011 a população mundial alcançou a marca de 7 bilhões. Isto nos leva a velha questão de Malthus: Haverá comida para todos? Apesar das previsões de Malthus esta Era tem sido de relativa abundância pelo desenvolvimento de tecnologias agrícolas que têm acompanhado o *boom* do crescimento populacional (MOON, 2011).

Hoje convivemos com o resquício da Era Agrícola e a plenitude da Era Motriz, onde o modelo começa a apresentar sinais de esgotamento pelas grandes devastações e degradação do meio ambiente. Embora a consciência da preservação dos recursos naturais que iniciou em 1970, comece a gerar movimentos que pretendem utilizar a terra e os seus recursos de forma coerente, “o perfil e a formação dos pesquisadores continua sendo convencional” (GOMES, 1999). Muitos projetos continuam sendo apresentados com a mesma lógica de pesquisa por pesquisadores consagrados que mantém os vínculos epistemológicos e metodológicos

convencionais, dificultando a transição da pesquisa (GOMES, 1999), de forma a permitir o uso do controle biológico ou integrado. Mas é inegável os muitos êxitos alcançados pelo paradigma atual, como, por exemplo, o papel dos microrganismos na ciclagem do nitrogênio (DELÉAGE, 1993).

A compreensão de muitos fenômenos biológicos ocorre no campo da fisiologia, bioquímica e microbiologia que tem potencial para proporcionar as condições biotecnológicas para a transição que se pretende, iniciando com a transição de controle de doenças na agricultura a base de produtos químicos para um controle integrado com menor porcentagem residual de contaminantes no solo e nas plantas.

## 2.2. CONTROLE DE DOENÇAS EM PLANTAS

### 2.2.1. Controle convencional

O controle convencional de doenças em plantas vem sendo feito com fungicidas em larga escala a partir da descoberta da calda bordalesa (sulfato de cobre e cal hidratada) por Millardet em 1882 na França, sendo o principal fungicida usado por 50 anos, seguido pelos organo-mercuriais (1914) e ditiocarbanatos (década de 1930). Todos tem em comum o fornecimento de proteção de superfície e não penetração nos tecidos, o que seria fitotóxico, pois são inibidores de processos vitais. O final da Segunda Grande Guerra foi marcado pelo desenvolvimento de fungicidas que penetrassem nas plantas erradicando ou protegendo-as contra patógenos sendo então inicialmente aceitos o benomyl e carboxin de largo espectro, seguidos de outros fungicidas sistêmicos mais seletivos como os benzimidazóis (GHINI & KIMATI, 2002).

O modo de ação de alguns fungicidas sistêmicos são conhecidos de forma razoável. Dentre estes podemos citar benzimidazóis, oxatinas, inibidores da biossíntese de ergosterol e fenilamidas, mas a ação exata de muitos outros não é ainda esclarecida (LYR *et al.*, 1999), como as anilopirimidinas que inibem a síntese de proteínas extracelulares de alguns patógenos como o *B. cinerea* (GHINI & KIMATI, 2002).

Mesmo com estas poucas informações a agricultura moderna tem sido tradicionalmente dependente dos pesticidas sintéticos, que se apresentam como uma alternativa bastante atraente pela sua simplicidade de aplicação com resultados satisfatórios em curto prazo e por não exigir conhecimento dos processos básicos do agrossistema ecológico (TALAMINI & STADINIK, 2004). Mas por outro lado, trazem como

consequência, graves problemas de ordem ambiental (MELO & AZEVEDO, 1999), como a supressão da microflora, favorecendo o aparecimento de outros patógenos e/ou linhagens resistentes ao princípio ativo destes produtos (DUBOS *et al.*, 1989; CAPIEAU *et al.*, 2004), como a resistência de *B. cinerea* em ciclames, observada em 1971 por Bollen & Scholten na Holanda, após dois anos de uso de benzimidazóis e na Itália junto com dicarboxinas em diversas culturas (GULLINO e GARIBALDI, 1983) No Brasil vários pesquisadores constatarem a resistência deste patógeno ao controle químico em estudos feitos com morango, eucalipto, roseira, berinjela, crisântemo, batata, ciclame, violeta, begônia, pimentão, maçã, e uva (GHINI & KIMATI, 2002).

Para Ghini & Kimati (2002) a resistência é um dos problemas mais sérios do controle químico das doenças em plantas atualmente, podendo ser desastrosa para vários segmentos da cadeia produtiva. Além disso, o uso inapropriado de pesticidas aplicados durante o ciclo de diferentes culturas constitui risco à saúde do homem, aumento do custo de produção (VALDEBENITO-SANHUEZA *et al.*, 1997a) pela intensificação das reaplicações cada vez mais frequentes pelos produtores que não obtiveram o resultado de controle esperado, encarecendo os produtos e acumulando resíduos prejudicando a sociedade como um todo (GHINI & KIMATI, 2002).

Estratégias de biocontrole envolvendo testes com organismos candidatos representam uma alternativa aos fungicidas, oferecendo novas dimensões e flexibilidade na escolha do manejo de doenças (SUTTON, 1994, VALDEBENITTO-SANHUEZA, R. M. *et al.*, 2008)), com vantagens sobre métodos convencionais com pesticidas de amplo espectro (MELO & AZEVEDO, 1999).

### 2.2.2. Controle biológico

O mundo precisa de uma mudança eminente que garanta alimento e conserve o potencial produtivo do solo, abalado por resquícios da Era industrial. A preocupação com o uso de produtos químicos e sua relação com conservação do solo, resistência dos patógenos aos fungicidas utilizados, aumento da demanda e exigência do consumidor por produtos alimentares livres de resíduos deixados pela aplicação de agrotóxicos, incentivam estratégias e métodos alternativos para o controle de doença em diversas culturas, entre os quais se inclui o controle biológico (REDMON *et al.*, 1987; PENG & SUTON, 1991; LOPES, 2009; MORANDI, 2009).

O controle biológico consiste basicamente em selecionar microrganismos antagonísticos a serem utilizados no controle ou supressão de patógenos causadores de doenças em plantas. Para Bettiol (1991) estes microrganismos antagonísticos devem ser procurados em áreas onde a doença causada por um patógeno não ocorre ou é diminuída, mas para Backer & Cook (1974), o efeito antagonista pode ser encontrado em qualquer local, entretanto o estudo destes locais associa-se as características do fungo que se pretende encontrar. No caso de endófitos, podem ser isolados de várias partes de plantas assintomáticas e, depois de purificados, usados como antagonísticos (AZEVEDO, 2003; SOUZA *et al.*, 2004). As principais características que se procura nestes isolados são a apresentação de propriedades que facilitem sua aplicação na superfície das plantas ou solo e ter rápida colonização além de ter mais de um mecanismo de antagonismo, como competição, parasitismo e antibiose (WODY & TVEIT, 1955, citados por BETTIOL, 1991a) não devendo ser fitopatogênicos (BETTIOL, 1991a) para as plantas em que deverão ser aplicados.

Embora o conhecimento de microrganismos como agentes de controle de doenças em plantas remonte centenas de anos, a ação destes sobre fitopatógenos era pouco conhecida. Mesmo no início da década de 20 do século XX nos primeiros estudos sobre ação antagonista de alguns microrganismos que reduziam doenças de raízes, não se conheciam os mecanismos envolvidos. O primeiro registro em artigo publicado sobre controle biológico no Brasil foi em 1950 por Reinaldo Foster, em trabalho com relação ao mosaico do fumo controlado pelo fungo *Trichoderma*. Os primeiros produtos com base conceitual e científica utilizando microrganismos no mundo surgiram somente na década de 70 (LOPES in BETTIOL & MORANDI, 2009), mas as estruturações nesta área no Brasil, somente foram feitas entre 1986/87 em Piracicaba, SP, após o que foi disponibilizado pelo Centro Nacional de Pesquisa de Fruteiras de Clima Temperado, da Embrapa por Valdebenito-Sanhueza, o produto comercial *Trichoderma viride* para controle de *Phytophthora cactorum* em macieira (BETTIOL & MORANDI, 2009).

Em 1992 foi criada a primeira disciplina sobre controle biológico de doenças em plantas por Wagner Bettiol em um curso de pós-graduação da UNESP/ Botucatu, SP. No mesmo ano foi criada a primeira empresa especializada em produção e comercialização de *Trichoderma*, sendo que o registro do primeiro fungicida biológico contendo o antagonista *Trichoderma harzianum*, para biocontrole somente aconteceu em 2008. No ano de 2009 o CNPq aprova o projeto para determinação de metodologias e avaliação da qualidade dos produtos biológicos para controle de doenças em plantas (MORANDI & BETTIOL, in BETTIOL & MORANDI, 2009).



Hoje no Brasil podemos citar estudos de controle de nematóides em goiabeira por gorgulho (*Conotrachelus psidii*); pré imunização contra tristeza dos citros por estirpes fracas do vírus (LOPES, 2009); controle do mofo cinzento em diversas culturas pelo fungo *Clonostachys rosea*, (BOECHAD & BETTIOL, 2009), controle de nematóides por estirpes de *C. rosea* em laboratório (ZOU *et al.*, 2010), além de fungos conhecidamente patogênicos que podem exercer antagonismo a outros patógenos, produzindo metabólitos e enzimas de inibição e/ou destruição de tecidos como as micotoxinas de *Penicillium* sp e *Aspergillus* SP (DURÁN in ESPOSITO & AZEVEDO, 2004) e glucanases e eniatinas de *Fusarium* sp.(POHANKA, 2004).

No comércio diversos produtos biológicos estão disponíveis, entre eles encontramos o vírus PRSV-W pré imunizante contra o mosaico da abobrinha; *Acremonium* para a lixa do coqueiro; *Bacillus subtilis* para controle de diversas doenças; *Trichoderma* sp para controle de patógenos de solo, substrato e parte aérea de diversas culturas (BOECHAD & BETTIOL, 2009).

A manipulação exercida pelo homem, porém, deve ir além da aplicação de microrganismos antagônicos no momento apropriado. É preciso dar condições para seu desenvolvimento mantendo o equilíbrio biológico existente no solo. Quanto mais complexa for a comunidade microbiana do solo, maior a sua estabilidade (REIS, 1991). Métodos químicos tendem a produzir flutuação em nível de doença, enquanto o biológico tende à estabilidade e baixo nível desta (BAKER & COOK, 1974).

Nesta óptica, o manejo de práticas culturais pode ou não favorecer as atividades microbianas. Fungos de solo dependem principalmente de rotação de cultura que diminui o hospedeiro e controla os patógenos que tenham poucas estruturas de sobrevivência; acréscimo de substratos orgânicos podem estimular o antagonista; métodos que melhorem a estrutura do solo e manejo de restos de cultura podem servir de base nutricional para início de infecção de colo de planta como no trigo, ou como material de manutenção de propágulos em dormência para patógenos como *B. cinerea* (VALDEBENITO-SANHUEZA, 1991).

No biocontrole de *B. cinerea* deve ocorrer a colonização do filoplano pelo agente antagônico, antes da instalação do patógeno diminuindo a esporulação deste e retardando a disseminação e a produção das estruturas de sobrevivência. A estratégia de tratamento preventivo recomendada e utilizada na aplicação de inóculo a campo foi a sugerida por Dubos & Bulit, (1979), Blakeman & Fokema (1982) e Valdebenito-Sanhueza *et al* (2007). Segundo estes autores, a instalação prévia e colonização de antagônicos nos frutos, dependem de se efetuar os tratamentos com os antagonistas a partir da floração, dando aos antagonistas a

oportunidade de colonizar a base nutritiva proveniente das partes florais senescentes, antes da chegada do patógeno.

A possibilidade de novos estudos e os resultados atuais na área de biocontrole, bem como a exigência do mercado consumidor, principalmente o de exportação, por produtos de alta qualidade e sem resíduos tóxicos de produtos químicos, incentiva o produtor brasileiro que vem buscando aumento de sua exportação investindo em práticas biotecnológicas na busca principalmente de qualidade (RETZ *et al.*, 2007).

### 2.3. UMA VISÃO AGRÍCOLA: OS PEQUENOS FRUTOS

Habitantes naturais de solo europeu, os pequenos frutos conhecidos como berries são destaques por apresentarem grande potencial econômico entre os pequenos produtores com custo médio de implantação e de fácil manutenção estando hoje entre os sistemas de produção com franca ascendências nas regiões de maior altitude e clima frio do Brasil (ANTUNES *et al.*, 2002), segundo maior produtor destas frutas em ranking mundial (RETZ *et al.*, 2007; GRIMALDI *et al.*, 2008).

Entre os pequenos frutos, o mirtilo conhecido como blueberry (inglês) e arândano (espanhol), é uma baga achatada de cor azul intenso coroada por lóbulos persistentes do cálice, cujo tamanho gira em torno de 1 a 2,5 cm de diâmetro e 1,5 a 4 g de peso (FACHINELLO, 2008). O fruto de sabor exótico (FISHER *et al.*, 2008) foi introduzido no Brasil em 1983 pela Embrapa Clima Temperado (Pelotas, RS) para pesquisas, mas foi em Vacaria que surgiu a primeira iniciativa comercial a partir de 1990, alcançando hoje 20,7 ha de plantio com produção estimada de 62,3 toneladas de frutas na safra de 2009/2010. Entre as frutas é uma das mais ricas em antioxidantes estudadas (ANTUNES, 2002; SALGADO, 2003; PAGOT, 2010), com conteúdo elevado de polifenóis, tanto na casca como na polpa, os quais conferem funções de proteção sobre as paredes das células humanas (FACHINELLO, 2008) e antocianinas, que fortalecem as paredes das artérias (COUTINHO & GOMES, 2005), sendo que as associações destes compostos conferem benefícios neurocognitivos, atuando como preventivo potencial dos mecanismos neurais e doenças neurovegetativas dos seres humanos (COULTRAP *et al.*, 2008; KRIKORIAN *et al.*, 2010). Por esses motivos vem sendo chamada de fonte de longevidade (SILVA *et al.*, 2008).

A amora conhecida como blackberry (inglês) e mora (espanhol) é um fruto agregado ou mini drupas vermelhas (ANTUNES *et al.*, 2002). De sabor levemente ácido, teve impulso no Brasil a partir de 1974, importada pela Embrapa Clima Temperado (Pelotas RS). Hoje é

considerada de maior cultivo entre os pequenos frutos da região sul do país onde a área de maior concentração está na região dos Campos de Cima da Serra no RS (PAGOT, 2003), com área de produção atual estimada em 211,6 ha, tendo alcançado na safra de 2009/2010 produção de 883 toneladas destas frutas (PAGOT, 2010). É uma fruta rica em vitamina C e E apresentando substâncias antixidantes com alto valor terapêutico (SALGADO, 2003), vitamina A, B e cálcio (KRAHE *et al.*, 2008) sendo ainda considerada sua ação quimiopreventiva contra o câncer (WARGOVICH, 2006), calmante, digestiva, anti-séptica e refrescante (COUTINHO & GOMES, 2005).

A framboesa conhecida como raspberry (inglês) e frambuesa (espanhol) é assim como a amora, um fruto agregado e de minidrupas vermelhas (ANTUNES *et al.*, 2002), de flavor único e sabor adocicado e delicado (KRAHE *et al.*, 2008). Considerada antioxidante (SALGADO, 2003), cujos frutos vermelhos são estudados como agentes quimiopreventivos contra o câncer (WARGOVICH, 2006). A framboesa foi introduzida no Brasil inicialmente em Campos do Jordão na serra da Mantiqueira, não sendo possível precisar a data. Hoje os maiores produtores estão entre os estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, em regiões de grande altitude. No Rio Grande do Sul destaca-se a região dos Campos de Cima da Serra (PAGOT & HOFFMANN, 2003), tendo iniciado com a implantação de um hectare experimental em 1989 (KRAHE *et al.*, 2008), produzindo hoje em 11 ha, 81,2 toneladas na safra 2009/2010 (PAGOT, 2010).

Na safra de 2009/2010 as culturas de amora, framboesa e mirtilo juntas alcançaram um total de 242,7 ha de área cultivada nos Campos de Cima da Serra produzindo 1026,5 toneladas (PAGOT, 2010). Porém estes pequenos frutos apresentam sintomas de diversas moléstias causadas por microrganismos como fungos, bactérias e vírus, que têm trazido sérios problemas à produção. Dentre estas podemos destacar aquelas cujos agentes casuais são fungos.

Segundo Valdebenito-Sanhueza (2004), o mirtilheiro apresenta a requeima de flores e podridão de frutos (*Botrytis cinerea*), cancro dos ramos por *Botryosphaeria* (*Botryosphaeria corticis* (oito raças fisiológicas), requeima de ramos (*Botryosphaeria: Botryosphaeriadothidea*, *Phomopsis: Phomopsisvaccinii*), mumificação dos frutos (*Monilinia vaccinii-corymbosi*), Oídio (*Microsphaera vaccinii*), mancha das folhas e cancro (*Gloeosporium: Gloeosporium minus*, *Sinn-Marssonina*), mancha de folhas e cancro de ramos (*Septoria: Septoria albuginea*), antracnose (*Glomerella cingulata*), mancha dupla (*Dothichiza carolinia*), mancha das folhas (*Gloeocercospora: Gloeocercospora inconspícua*), mancha das folhas e podridão de frutos (*Alternaria tenuissima*), ferrugem da folha

(*Pucciniastrum vaccinii*), podridão de raízes (*Armillariella mellea* (A. *ostoyae*), *Phytophthora cinnamomi*), galha da coroa e dos ramos (*Agrobacterium tumefaciens*, A. *rubi*).

Razeiras (2004) relaciona as seguintes doenças fúngicas que atacam os pomares de framboesa: mofo cinzento ou podridão do fruto (*Botrytis cinerea*), podridão do colo (*Phytophthora infestans*), antracnose (*Elsinoe veneta*/*Sphaceloma necator*), sarna (*Cladosporium* sp.), requeima dos brotos (*Dydymella aplanata*), ferrugem amarela (*Phragmidium rubi-idaei*), ferrugem tardia das folhas (*Pucciniastrum americanum*), oídio (*Sphaerotheca macularis*), mancha das folhas (*Cylindrosporium rubi*), podridão das raízes (*Phytophthora* sp. e *Fusarium* sp.) e galha da coroa e dos ramos (*Agrobacterium tumefaciens* e A. *rubi*).

As amoreiras comumente apresentam sintomas de mofo cinzento (*Botrytis*), antracnose (*Elsinoe veneta* / *Sphaceloma necator*), cancro dos ramos da amoreira (*Botryosphaeria dothidea*), mancha das folhas por (*Septoria rubi*), podridão dos frutos (*Colletotrichum gloeosporioides*), galha da coroa e dos ramos (*Agrobacterium tumefaciens*, A. *rubi*), ferrugem alaranjada (*Gimnoconia nitens*: A. *peckiana*), Ferrugem dos ramos e folhas (*Kuehneola uredinis*) e ferrugem da amoreira preta (*Phragmidium violaceum*) (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2004).

Dentre todos os microrganismos patogênicos alguns são polígrafos e infectam todo o grupo de pequenos frutos como é o caso do fungo necrotrófico *Botrytis cinerea*, causando enormes perdas aos produtores, que não encontram no mercado, produtos agroquímicos registrados para o manejo fitossanitário desta doença nestas culturas (PAGOT, 2010).

#### 2.4. O FUNGO *Botrytis cinerea*: AGENTE CAUSADOR DO MOFO CINZENTO EM PEQUENOS FRUTOS

O fungo necrotrófico *B. cinerea* (Pers. Ex Fr. estágio perfeito=*Botryotinia fuckeliana* (de Bary) parasita de várias culturas em regiões úmidas do planeta, causa epidemias de mofo cinzento que apodrecem frutos em diversas fases de desenvolvimento até chegar à mesa do consumidor (VALDEBENITO-SANHUEZA *et al.*, 1997; BOFF *et al.*, 2001, ELAD *et al.*, 2004, WILLIAMSON *et al.*, 2007). Passando o inverno, esporula na primavera sobre folha mortas e frutos mumificados, cujos esporos são carregados pelo vento e pela água (BERRIE, 2000), podendo ainda ser disseminados por processos de irrigação e vetores.

Os sintomas da podridão causada por *B. cinerea* nos frutos são manchas de aspecto encharcado, deprimidas e descoloridas, que crescem rapidamente. Os frutos tornam-se moles,

aquosos e de coloração marrom clara. Em condições de campo, o patógeno se desenvolve nas partes mortas das plantas, e a partir delas, iniciam a colonização de tecidos saudáveis. Ao apodrecerem os tecidos, a epiderme se rompe, e sobre ela se desenvolvem as estruturas do fungo (AGRIOS, 1997).

No framboeseiro e amoreira as flores ainda em botão raramente são colonizadas, mas as flores abertas são suscetíveis. Conídios pegajosos em contato com as estruturas florais frutos e/ou folhas germinam e suas hifas crescem por todo o espaço intercelular atingindo os tecidos em aproximadamente sete dias (ELLIS *et al.*, 1997).

Nas epidemias de *B. cinerea* em pequenos frutos, o pólen não precisa estar presente para os conídios germinarem no estigma. A antera, os filamentos, os estames e as pétalas são também colonizados. O receptáculo do fruto e outras partes estéreis ficam expostos até a colheita (Figura 1).



Figura 1 - Fases de desenvolvimento de amora e fontes iniciais de infecção.

A. Flor; B. Restos de Estigma; C. Receptáculo floral, desenvolvimento do carpelo e restos de estilete; D. Restos de estame e estilete em fruto desenvolvido.

As infecções iniciais das partes das flores são consideradas latentes (ELLIS *et al.*, 1997). A colonização ocorre após esta fase não patogênica ou infecção latente em pétalas senescentes, onde o micélio produzido pode invadir os tecidos do fruto. Pela grande oferta de água e açúcar, o fruto maduro apresenta excelentes condições ao desenvolvimento do fungo (AGRIOS, 1997). O patógeno pode permanecer quiescente no receptáculo floral até o amadurecimento deste, produzindo lesões necróticas em pré ou pós colheita (BOFF *et al.*, 2003; MORANDI *et al.*, 2002). As condições que propiciam o aparecimento desta doença nos frutos são alta umidade relativa do ar, ventos e temperatura entre 18 a 23°C, podendo manter atividade até a 0°C (RONQUE, 1998). No Sul do País estas condições são frequentes, e os pequenos frutos como o mirtilo, a framboesa e a amora preta são comumente atacados por este patógeno na pré e pós colheita (PAGOT, 2006), ocasionando perdas aos produtores.

## 2.5. OS FUNGOS *Clonostachys rosea* E *Trichoderma* spp: UMA HISTÓRIA DE BIOCONTROLE

### 2.5.1. *Clonostachys rosea*

Dentre os agentes de controle biológico testados para controlar *B. cinerea*, o fungo filamentosso *Clonostachys rosea* foi observado como um eficaz e versátil antagonista em estudos no final da década de 1980 (SUTTON *et al.*, 1997), sendo isolado na Universidade de Guelph, Canadá, em junho de 1993 de folhas de morangueiro em trabalhos de seleção de antagonismo a *B. cinerea* (PENG & SUTTON, 1991). Ambos os fungos invadem a folha de morangueiro ainda jovem e progressivamente colonizam os tecidos foliares, quando a folha se torna senescente (SUTTON, 1994), esporulando somente sobre as folhas mortas. É comum encontrar *C. rosea* em folhas de morangueiro sem causar sintomas de moléstia (SUTTON, 1992).

O micoparasita necrotrófico *C. rosea* (Link: Fr.) vem sendo citado como antagônico a *B. cinerea* em estudos de diversas culturas (DUBUS, 1989; SUTTON, 1994; MORANDI *et al.*, 2003; YAHALEM, 2003; YAHALEM *et al.*, 2004; CAPIEAU *et al.*, 2004; ZAMBONI-PINOTTI *et al.*, 2005). Pertencente ao Filo Ascomycota; Sub-filo Pezizomycotina; Classe Sordariomycetes; Subclasse Hypocreomycetidae; Ordem Hypocreales; Família Bionectriaceae (Base de dados do NCBI, 2011) é inócuo ao homem ao colonizar frutos eficientemente (SUTTON citado por VALDEBENITO-SANHUEZA *et al.*, 1997).

Habitante natural do solo *C. rosea* pode viver saprofiticamente ou parasitando outros fungos como *B. cinerea* (MORANDI *et al.*, 2003), atuando por competição pelo substrato com o patógeno, impedindo ou reduzindo sua colonização (VALDEBENITO-SANHUEZA *et al.*, 1997a), micoparasita *B. cinerea*, infectando conídios e tubos germinativos através da penetração direta pelas pontas das hifas sem a formação de apressórios (LI *et al.*, 2002). O recuo e ruptura das paredes da célula hospedeira pela penetração das hifas em conídios e tubos germinativos parasitados de *B. cinerea* que apresentaram sinais de desintegração citoplasmática podem ser vistos em microscopia eletrônica (Figura 2) (Li *et al.*, 2002).

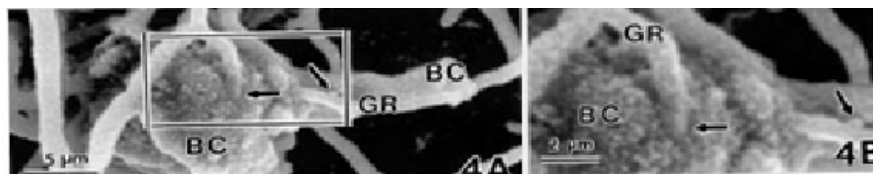


Figura 2 - Colonização de hifas em conídios e tubos germinativos de *B. cinerea* (BC) de *C. rosea* (ex *G. roseum*) (GR). É possível observar as penetrações de hifas em conídios (Figura 4A, B, seta para a esquerda) e em tubos germinativos (4A, B, seta para a direita) de *B. cinerea* (LI *et al.*, 2002; HUNG *et al.*, 2002).

### 2.5.2. *Trichoderma* spp

O fungo *Trichoderma* spp. é encontrado na maioria dos solos, incluindo a camada de húmus das florestas (WARDLE *et al.*, 1993) e se apresenta sob várias espécies consideradas efetivas como agentes de biocontrole de fungos fitopatogênicos de plantas de importância econômica (CASSIOLATO & SOUZA, 2000).

A primeira publicação sobre o uso de *Trichoderma* spp como agente de controle biológico de doenças de plantas no Brasil, foi em 1950 por Foster, mas somente em 1987 um produto com este fungo foi usado comercialmente no Brasil contra *Phytophthora cactorum*, causador da podridão de raízes (VALDEBENITO-SANHUEZA, 1991). Vários estudos foram conduzidos com este antagonico desde então, sendo atualmente o mais utilizado no Brasil e outros países da América Latina (BETTIOL & MORANDI, 2009).

Em abril de 2008 foram identificadas 13 empresas produtoras de *Trichoderma* no Brasil em formulações de grãos colonizados, pó molhável, suspensão concentrada, grânulos dispersíveis, óleo emulsionável e esporos secos. Os patógenos alvos *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Macrophomina*, algumas espécies de *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Crinipellis* e *Botrytis* para as culturas de feijão, soja, algodão, fumo, morango, tomate, alho, cebola, plantas ornamentais e cacau. Sendo também recomendado para tratamento de sementes (BETTIOL & MORANDI, 2009) e compostos para crescimento de plantas (SILVA-RIBEIRO, 2001; GUIMARÃES, *et al.*, 2008).

No controle de *B. cinerea* trabalhos realizados mostram penetração de uma espécie de *Trichoderma harzianum* Rifai em hifas de *B. cinerea* 72 horas após o contato, sendo detectada após 10 dias atividade de quitinase (BÉLENGER *et al.* 1995). Silva-Ribeiro (2001) demonstra o crescimento deste patógeno inibido por substâncias tóxicas voláteis produzidas por *Trichoderma* spp, e Noronha e Ulhoa (2000) purificaram uma  $\beta$ -1,3 glucanase de *Trichoderma harzianum* sendo que camada de  $\beta$ -glucana corresponde à camada interna da parede celular de alguns microrganismos e pode ser hidrolisada por  $\beta$ -1,3 glucanases Fleuri & Sato (2005), entre outros.

Conhecidos e ativos micoparasitas de fitopatógenos, *Trichoderma* spp. e *C. rosea* destacam-se por apresentarem interações antagonistas, podendo atuarem através de um ou de uma associação de mecanismos definidos por:

1. Antibiose: Compreende a secreção de metabólitos secundários tóxicos a fitopatógenos (MELO, 1996). Dentre estes metabólitos, estudos tem mostrado a produção de antibióticos por *Trichoderma* sp (BELANGER *et al.*, 1995; GRAUME- COOK & FAUL, 1999; HOWELLI, 2006).

2. Competição: É a relação negativa entre duas populações, em que ambas são afetadas com relação ao crescimento destas, no que diz respeito a espaço ou nutrientes limitantes (MELO, 1996).

3. Micoparasitismo: Em uma relação de parasitismo, o parasita geralmente prejudica o hospedeiro por uma questão de requerimento nutricional deste. Dentre os mecanismos antagônicos, é o que mais se destaca (SILVA-RIBEIRO, 2001). Os micoparasitas biotróficos ocupam células vivas, enquanto os necrotróficos matam células hospedeira por ocasião do contato e penetração, como é o caso dos fungos antagônicos em questão. O micoparasitismo envolve a localização, contato e penetração com consequente obtenção de nutrientes (MELO, 1996). Após o contato *Trichoderma* sp e *C. rosea* continuam a crescer sobre a hifa hospedeira, geralmente enrolando-se em sua extensão (MELO, 1996; VALDEBENITO-SANHUEZA, 1997). Imagens de microscopia eletrônica de varredura (Figura 3) mostram micoparasitismo de *C. rosea* (ex *Gliocladium roseum*) sobre *B. cinerea* (LI *et al.* 2002).

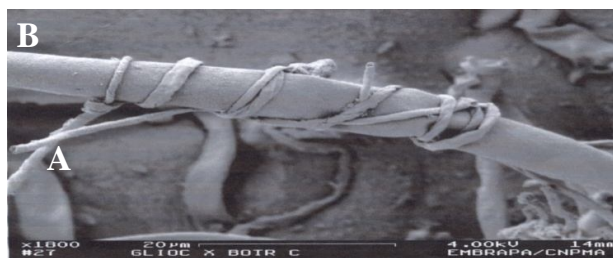


Figura 3 - Microscopia eletrônica mostrando hifas finas de *C. rosea* (A) parasitando hifas de *B. cinerea* (B) (VALDEBENITO-SANHUEZA, 1997 a).

A possibilidade destes fungos atuarem por ações antagonistas em conjunto remete a idéia de sinergismo. O termo sinergia, deriva do grego Synergia, cooperação no trabalho ou, efeito coordenado de vários sistemas para realizar um trabalho, tarefa complexa ou função. A sugestão de sinergismo entre toxinas e enzimas pode ser um evento comum, uma vez que a co-produção de enzimas líticas da parede celular e metabólitos tóxicos ocorram entre agentes de biocontrole. Estas enzimas combinadas agem sinergisticamente (LORITO *et al.*, 1993), não resultando em toxidez aos vertebrados e plantas, pois estes não contém o polímero de destino.

## 2.6. UMA VISÃO HOLÍSTICA: PATÓGENOS USADOS EM BIOCONTROLE



Estudos apontam que reconhecidos patógenos como *Penicillium* spp, *Fusarium* spp. (ZAZZERINI & TOSI, 1985) e *Fusarium solani* (Mart) Sacc. (ILLIPRONTI & MACHADO, 1993) vêm sendo usados no controle de *S. sclerotiorum*. O fungo *Fusarium oxysporum* não patogênico é apontado por Fravel (2008) como biocontrolador de patógenos veiculados ao solo com efeito supressor.

Vários fungos produzem pigmentos fúngicos que são ativos contra bactérias, leveduras, fungos e protozoários que se difundem em meio de cultura tipo Agar, podendo variar de cor dependendo do pH (SEIFERT, 2001). Para Blanc (1998), *F. oxysporum* produz um pigmento fúngico do tipo quinonas que correspondem a ampla variedade de cores como o amarelo, laranja, rosa e vermelho, de acordo com a posição do grupo ceto, metabólitos secundários que não possuem função clara no crescimento celular, porém são de importância biotecnológica e agrícola. Duran *et al.*, in Esposito e Azevedo (2004) constataam que os mais importantes pigmentos produzidos por *F. oxysporum* são as antraquinonas capazes de “permeabilizar a membrana plasmática de *B. cinerea*, aumentando a concentração de fósforo no meio intracelular” (MENDONZA *et al.*, 2005).

Outros metabólitos que são reportados no controle de *B. cinerea* são derivados de fungos filamentosos (GULINO, 2000; THINES, 2004). Alguns destes compostos como as eniatinas produzidas por *Fusarium* sp. podem inibir a germinação de conídios (POHANKA, 2004), enquanto enzimas de importância agroecológica produzidas por diferentes cepas de *Trichoderma* e *Fusarium* sp., como celulasas ( $\beta$ -glucosidanasas,  $\beta$ 1-4 glucanasas) lisam paredes, micélios e conídios de patógenos (ATLAS & BARTH, 2002).

Parasita de plantas ou saprofítico em plantas em decomposição (BARNET & HUNTER, 1972), *F. oxysporum* pode formar dentro de cada espécie uma subdivisão ou *formae speciales* que consiste em uma certa especificidade, tanto por determinadas plantas hospedeiras, como também pelo tecido vascular destas plantas, não se manifestando em outras culturas (EGGERT *et al.*, 2010), podem ainda sobreviver saprofiticamente por longo tempo, na matéria orgânica (EDDEL *et al.*, 1997).

Como podemos ver, o detalhamento dos ecossistemas vem mostrando claramente que a maioria das relações entre os seres vivos são essencialmente cooperativas com caráter de coexistência e interdependência simbiótica em vários graus (CAPRA, 1982). Apesar do conhecimento vigente sobre este caráter cooperativo observado em estudos de biocontrole, existe uma possibilidade infinita de encontrar microrganismos de interesse agrônomo, desconhecidos ou conhecidamente patogênicos com efeito antagônico, com potencialidade de uso em biocontrole ainda sem conhecimento. A constatação deste fato abre um leque de

possibilidades que não podem ser ignoradas incitando a novos estudos cada vez mais descomprometidos com os paradigmas atuais e mais comprometidos com a visão real do mundo.

### 3. HIPÓTESES

1. A aplicação associada dos fungos antagonistas *Trichoderma asperellum* e de *Clonostachys rosea* exerce efeitos sinérgicos que potencializam o controle de *Botrytis cinerea* em mirtilo, framboesa e amora, em relação ao efeito isolado dos mesmos.

2. Fungos antagonistas isolados a partir de solo sob a cultura que se deseja proteger tendem a serem mais eficientes do que isolados de outras culturas, no biocontrole de *B. cinerea*.

3. Os fungos de solo associados às culturas de amora, framboesa e mirtilo são afetados pelo sistema de manejo a que as culturas estão submetidas.

## 4. OBJETIVOS

### GERAL

Avaliar a ocorrência de sinergismo entre *Clonostachys rosea* oriundo de culturas de morangos e *Trichoderma asperellum*® no controle de *Botrytis cinerea* em culturas de amoreira, framboeseiro e mirtilheiro na região de Vacaria, Rio Grande do Sul; bem como o potencial antagônico de fungos isolados destas culturas e a possibilidade de seu uso a campo para o controle de mofo cinzento nas culturas de origem.

### ESPECÍFICOS

1. Avaliar o potencial sinérgico entre *Trichoderma asperellum* e o isolado GFO4 de *C. rosea* no controle de *B. cinerea* a campo.
2. Isolar linhagens de fungos com colônia de cor rosada, compatível com *C. rosea* de ocorrência natural no solo, onde se encontram estabelecidas culturas de amora, framboesa e mirtilo.
3. Relacionar a situação de cultivo do solo com o índice de colonização de fungos isolados, procurando estabelecer uma condição ótima para desenvolvimento de antagônicos naturais.
4. Avaliar o antagonismo entre *B. cinerea*, GFO4 de *C. rosea* e os fungos isolados de solo.
5. Caracterizar morfológica e geneticamente os isolados com melhor resposta antagônica a *B. cinerea* a campo, em culturas de amora, framboesa e mirtilo.

## 5. CAPÍTULO I

### **AVALIAÇÃO DE SINERGISMO ENTRE OS FUNGOS *Trichoderma asperellum* E A ESTIRPE GFO4 DE *Clonostachys rosea* CONTRA *Botrytis cinerea*, EM FRAMBOESA, AMORA E MIRTÍLO**

#### **RESUMO**

Os frutos de pequeno porte são comumente atacados por podridões em todo o mundo. Entre elas encontra-se o mofo cinzento causado pelo fungo necrotrófico *Botrytis cinerea*. Tentando minimizar prejuízos sem alterar o sabor natural dos frutos, bem como reduzir a acumulação de resíduos químicos no ambiente, estudos de biocontrole vêm sendo conduzidos com microrganismos antagonísticos. Dentre estes se encontram os fungos *Trichoderma* SP. e *Clonostachys rosea* que tem se mostrado eficientes no controle deste patógeno em várias culturas, porém ainda não foram relatados estudos de sinergismo resultante de co-inoculação entre estes antagonísticos. Este trabalho objetivou a avaliação de biocontrole sobre *B. cinerea* exercido por *Trichoderma* sp. e *C. rosea* e o possível sinergismo entre eles na ação antagonística a este fungo co-inoculados em frutíferas de amora (*Rubus fruticosus*), framboesa (*Rubus ideaus*) e mirtilo (*Vaccinium* spp.) sendo conduzido em parcelas de cinco plantas para cada tratamento e cultura de pomares comerciais instalados em Vacaria, Rio Grande do Sul, Brasil. Este controle foi testado inoculando por aspersão  $10^6$  conídios/mL de *C. rosea*, isolado GFO4 de morangueiros (EMBRAPA Uva e Vinho); além de  $10^6$  conídios/mL *Trichoderma asperellum*, sozinhos e co-inoculados, duas vezes por semana durante a floração das plantas. A avaliação considerou três plantas centrais de cada cultura e tratamento, das quais foram colhidos sete frutos por datas de colheita (sete) e avaliados no quarto dia de prateleira quanto ao aparecimento de sintomas de *B. cinerea*. Os resultados foram submetidos à análise estatística e as comparações de médias por meio do teste DMS de Fisher, considerando o nível mínimo de significância de 5% ( $P < 0,05$ ). A co-inoculação dos fungos *T. asperellum* e *C. rosea* apresentou o melhor controle do mofo cinzento nos frutos.

**Palavras-chave:** *T. asperellum*. *Clonostachys rosea*. Biocontrole. sinergismo.

**EVALUATION OF SYNERGISM BETWEEN THE FUNGUS *Trichoderma asperellum*  
AND STRAIN OF GFO4 *Clonostachys rosea* AGAINST *Botrytis cinerea* IN  
RASPBERRY, BLACKBERRY AND BLUEBERRY**

**ABSTRACT**

The small fruits are commonly attacked by rot around the world. Among them is the gray mold caused by the fungus *Botrytis cinerea* necrotrophic. Trying to minimize losses without changing the natural flavor of the fruit and reduce the accumulation of waste chemicals in the environment, biocontrol studies have been conducted with antagonistic microorganisms. Among these are the fungi *Trichoderma* sp and *Clonostachys rosea* that has proven effective in controlling this pathogen in many fruit crops, but have not been reported studies of synergism resulting from co-inoculation between these antagonistic. This study aimed to evaluate the biocontrol exercised of *B. cinerea* by *Trichoderma* sp and *C. rosea* and the possible synergism between them in the antagonistic action of this fungus co-inoculated in blackberry (*Rubus fruticosus*), raspberry (*Rubus idaeus*) and blueberry (*Vaccinium spp*) was conducted on plots of five plants for each treatment in a culture of commercial orchards installed in Vacaria, Rio Grande do Sul, Brazil. This control was tested by spray inoculating  $10^6$  conidia / mL of *C. rosea* isolated GFO4 of strawberry (EMBRAPA- CNPUV), in addition to  $10^6$  conidia / mL *Trichoderma asperellum* ® 1 alone and co-inoculated twice a week during the flowering plants. The evaluation has three central plants of each crop and treatment, seven of which were collected by fruit harvest dates (seven) and evaluated on the fourth day shelf for the emergence of symptoms of *B. cinerea*. The results were subjected to analysis of variance and comparisons of mean by DMS Fisher, test ( $P < 0,05$ ). The co-inoculation of the fungus *T. asperellum* and *C. rosea* had the best control of gray mold on fruits.

**Keywords:** *Trichoderma asperellum* . *Clonostachys rosea*. Biocontrol.

## 1. INTRODUÇÃO

O uso do controle biológico surgiu nas ultimas décadas como uma alternativa viável para reduzir a quantidade de produtos químicos, podendo ser aplicados de forma isolada ou dentro de um programa de manejo integrado de doenças. Estes métodos alternativos de biocontrole vêm sendo usados em várias culturas por meio da adição de microrganismos antagonicos como os micoparasitas necrotróficos *Clonostachys rosea* e *Trichoderma* ssp., que têm sido considerados eficazes, principalmente no controle de fitopatógenos com estruturas de resistência difíceis de serem atacadas (MELO, 1996).

O fungo *C. rosea* tem sido citado com antagonico ao patógeno *Botrytis cinerea* em vários sistemas de manejo e culturas de alface em hidroponia (PUNJA & YUP, 2003); flores como rosas (MORANDI *et al.*, 2003) e fúcsia (SILVERA- PÉREZ, 2006), em estufas; frutíferas como framboeseiro e amoreira a campo (ZAMBONI-PINOTTI *et al.*, 2005); bem como em produção de mudas como fúcsia (SILVERA-PEREZ, *et al.* 2010). O fungo *Trichoderma* ssp. em formulação comercial é relatado em estudos de biocontrole a *B. cinerea* principalmente em morangos (RICARD & RICARD, 1997).

A inibição de patógenos por antagonicos se dá principalmente por competição, micoparasitismo ou e antibiose, podendo ocorrer simultaneamente (PAPAVIZAS, 1985; VERO & MONDINO, 2002). O fungo *C. rosea* é conhecido como um micoparasita de hifas, esporos, escleródios e corpos frutíferos de diferentes fungos, entre os quais se encontra o *B. cinerea* (LI *et al.*, 2002). A capacidade deste fungo de crescer endofiticamente em tecidos imaturos permite competir com o patógeno pelos tecidos senescentes e esporular em folhas mortas. A antibiose, que é a produção de substâncias não tóxicas por parte de um microrganismo com efeito a curtas distâncias, está presente em *C. rosea* e segundo Howell, (1998) é responsável pela ação sinérgica em conjunto com outros mecanismos como competição e micoparasitismo.

O fungo *Trichoderma* sp. é amplamente descrito como capaz de associar-se a planta podendo mediar relações de sinergismo, bem como estabelecer comunidades muito complexas dentro de cada sistema radicular, podendo ser emergentes destas interações entre fungos, além de exercerem micoparasitismo e competição por nutrientes em patógenos

(BARTINICK & GARCIA, 1968). A complexidade e o sinergismo com que se apresentam as ações de biocontrole de *Trichoderma* ssp. são as causas mais prováveis de sua eficiência no controle de *B. cinerea* (COOK, 1993). O micoparasitismo de *Trichoderma* ssp. é citado Howell (2006). Os mecanismos de ação entre enzimas e antibiótico apolares produzidos por ele apesar de demonstrarem sinergismo, considera-se que o modo de ação das pironas não está bem elucidado (HOWEL, 1998).

No entanto a aplicação exclusiva deste antagonico resulta em controle parcial de *B. cinerea*, se a doença ocorrer em alta incidência o que poderia ser evitado, segundo GULLINO *et al.* (1985), com a mistura de várias linhagens do antagonista para evitar a falha de um único isolado e/ou explorar possível sinergismo entre diferentes isolados.

A co-produção de enzimas líticas da parede celular e metabólitos tóxicos ocorrem entre agentes de biocontrole. Estas enzimas combinadas agem sinergisticamente (LORITO, *et al.*, 1993). No biocontrole de *B. cinerea*, diferentes classes de enzimas de degradação celular são produzidas. Para Bartnicki & Garcia (1968) a maioria dos fungos patogênicos contém quitina e 1,3-P glucanos em suas paredes celulares e a dissolução ou perturbação destes polímeros estruturais têm efeitos negativos sobre o crescimento e diferenciação destes fungos. Espécies de *Trichoderma* e *Clonostachys* produzem enzimas quitinase e endoquitinases de degradação celular que podem reagir sinergisticamente com propriedades antifúngicas e são capazes de controlar eficazmente fungos fitopatogênicos como *B. cinerea* inibindo a germinação de esporos *in vitro* (LORITO *et al.*, 1993) e/ou degradam a quitina, glucano e celulose que são responsáveis pelas paredes celulares do patógeno (MAMARABADI *et al.*, 2004).

Pesquisas sobre a interação entre microrganismos do solo quando co-inoculados já demonstraram efeitos positivos no crescimento da planta, como FMA e bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCP), por Lovato *et al* (1996). Outras pesquisas como a realizada por Muthukumar *et al.* (2001), mostram que a co-inoculação simultânea com FMA e *Azospirillum brasilense* em mudas de *Azadirachta indica* A. Juss, apresentam efeito sinérgico no crescimento, enquanto, atualmente Oliveira *et al.* (2011), aponta a co-inoculação e consequente colonização de fungos micorrízicos e bacterias do gênero *Rhizobium*, em condições controladas, como responsável pelo melhor desenvolvimento radicular de mudas de *Acacia mangium*, tendo aumentado a sobrevivência destas quando transferidas para o campo. As probabilidades de crescimento em associações entre microrganismos podem apontar para outros tipos de sinergismo, como o biocontrole.



No entanto, a ocorrência de mutações espontâneas nas estirpes das coleções de culturas de rizóbios e bradirrizóbios é um fator que tem comprometido o processo simbiótico, uma vez que esta variabilidade representa um problema potencial para a manutenção e indicação de estirpes na fabricação de inoculantes (BANGEL, 2000) com possibilidade desta variabilidade ocorrer com todos os candidatos antagônicos. Em geral, ao serem comparados às estirpes parentais, os variantes apresentam alteração de importantes características simbióticas, que envolve desde a perda de infectividade (KUYKENDALL & ELKAN, 1976) a alterações na eficiência e potencial de competição por sítios nodulares (MULLEN & WOLLUM II, 1989).

Contudo, tem sido observada a ocorrência de variantes com alta eficiência simbiótica e poder competitivo (PERES *et al.*, 1984; SATO, 1995). Desta forma, acredita-se que estirpes do mesmo sorogrupo de reação ou variantes genéticos da mesma estirpe poderiam estar fazendo parte de um mesmo material biológico (MEYER & PUEPPKE, 1980; KORUSNY-ANDREANI, 1997).

Alguns estudos apontam efeitos positivos na nodulação pela co-inoculação de rizóbio com outras espécies de bactérias. Ao mesmo tempo em que apontam falta de informações mais precisas da tecnologia de co-inoculação como, por exemplo, de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* (BANGEL, 2000).

Acredita-se que a maior dificuldade oriunda dos problemas de co-inoculação pode estar relacionada a pouca informação. Em relação a *Trichoderma* e *C. rosea* não se encontram ainda, estudos quanto ao efeito de sinergismo pela co-inoculação dos dois antagônicos no controle de micoparasitas como *B. cinerea* em culturas de amora, framboesa e mirtilo. Isto suscita “ações de pesquisa sobre o entendimento de interações entre agentes de biocontrole, plantas e ambiente” (BETTIOL & MORANDI, 2009). A co-inoculação entre estes dois antagônicos apresenta efeito de sinergismo no controle deste patógeno nas culturas de amora, framboesa e mirtilo pela co-inoculação dos fungos *Trichoderma asperellum* e *C.rosea* (GFO4) sendo esta afirmação testada neste trabalho.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se o isolados GFO4 de *C. rosea* pertencentes à coleção da Embrapa Uva e Vinho que foram obtidos de morangos na serra gaúcha em trabalho feito por Dall'Onder *et al.* (2001) reproduzidos em grãos de trigo, conforme metodologia adaptada de Valdebenito-Sanhueza & Dall'Onder (2007), mantidos em frascos sob refrigeração de 4°C até o momento do preparo do inóculo, quando foram abertos asépticamente, e a partir da lavagem de 2g de grãos com posterior filtragem em algodão estéril, foram produzidos 4 L de suspensão aquosa na concentração de  $10^6$  conídios/mL conferida em câmara de Neubauer em água destilada.

Para o preparo do inóculos de *Trichoderma*, foi usado *T. asperellum* de (Novozymes BioAg®) na concentração de  $10^6$  conídios/mL, obtida com 2mL da formulação em 2L de água destilada e estéril, conforme informações do rótulo do produto.

Além dos isolados em separado foram aplicados *T. asperellum*® e GFO4 co-inoculados, acrescidos de espalhante adesivo (Age Bem), sendo que a testemunha recebeu somente água destilada como tratamento.

### 2.1. INSTALAÇÃO DO EXPERIMENTO A CAMPO

Foram escolhidas ao acaso 35 plantas de amoreira do cultivar Tupi com 11 anos de produção, 35 plantas de mirtilheiro do cultivar Raibash Duck com oito anos de produção e 35 plantas de Framboeseiro do cultivar Heritage com seis anos de produção, mantendo espaçamento de 3,00m X 0,30cm entre plantas para cada cultivo. Para cada tratamento com os candidatos antagônicos e para a testemunha foram escolhidas ao acaso quatro plantas de cada cultura.

Estas culturas estão estabelecidas em um pomar sob Latossolo Bruno Distroférrico típico da região dos Campos de Cima da Serra da cidade de Vacaria, RS, Brasil situado a uma distância de 7 km do ponto zero da cidade em direção a cidade de Lagoa Vermelha, a uma altitude de 957m. Este pomar que detém selo de produção orgânica e de qualidade de exportação estava sendo tratado com cama de aviário e com calda sulfocálcica e cobre, sendo

que a aplicação destes cessou bem antes da floração e início dos tratamentos com os antagonistas utilizados neste trabalho.

## 2.2. APLICAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS ISOLADOS A CAMPO

As aplicações foram realizadas com aplicador do tipo spray na parte aérea das plantas de cada parcela e cultura duas vezes por semana, sempre no final da tarde, a partir da pré floração até a colheita dos frutos.

Foram realizadas sete avaliações de frutos, colhidos duas vezes por semana. No momento da colheita foram consideradas três plantas centrais de cada cultura para cada tratamento, deixando uma planta entre os tratamentos como anteparo para evitar deriva. De cada planta considerada foram colhidos sete frutos colocados em bandejas separadas por cultura, tratamento e repetição sendo cobertas com saco plástico e deixadas em condições de prateleira à temperatura ambiente por quatro dias. Após este tempo cada fruto foi observado sob microscópio estereoscópio para a identificação de sinais de podridão cinzenta que apresenta aspecto encharcado, deprimido, com mofo cinza sobre a superfície.

Os resultados foram submetidos a análises estatísticas conforme o delineamento experimental do esquema de amostragem utilizado consistindo de 35 plantas alinhadas por cultura, demarcadas com tratamentos pré-determinados, adotando-se um modelo linear de análise de variância. As comparações entre os valores médios, de cada uma das variáveis nos diferentes tratamentos, espécies e semanas foram efetuadas por meio do teste DMS de Fisher. Para atenderem-se as pressuposições teóricas dos testes, para a variável número de frutos infectados foi adotada a transformação raiz quadrada conforme sugeridas pela análise descritiva dos dados. Para todos os testes efetuados foi considerado o nível mínimo de significância de 5%.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fungos *C. rosea* e *T. asperellum* quando aplicados isoladamente, apresentaram controle a *B. cinerea*, e a menor incidência da doença nas três culturas ocorreu nos tratamentos com estes fungos em co-inoculação (Tabela 1).

Espécies de *Trichoderma* e *Clonostachys* produzem enzimas quitinase e endoquitinases de degradação celular que possivelmente não resultaram em toxidez às plantas dos pequenos frutos utilizados neste trabalho, concordando com Lorito *et al.* (1993) que afirma que plantas em geral não apresentam o polímero de destino destas enzimas.

Para Gullino *et al.* (1983) a aplicação exclusiva de *Trichoderma* resulta em um controle parcial de *B. cinerea* se a doença ocorrer em alta incidência o que poderia ser evitado com a mistura de várias linhagens do antagonista para evitar a falha de um único isolado e/ou “explorar possível sinergismo entre diferentes isolados” (BETTIOL, 1991) acentuando o controle da doença.

Tabela 1 - Número de frutos de amoreira, framboeseiro e mirtilheiro com sintomas de *B. cinerea* em relação ao número total de frutos colhidos após tratamentos realizados com *Clonostachys rosea* (isolado GFO4) e *Trichoderma asperellum*.

Tratamentos	Culturas		
	Amoreira	Mirtilheiro	Framboeseiro
GFO4	0,52B	0,38B	0,29B
GFO4+Tricho	0,09C	0,19BC	0,04C
Tricho	0,61B	0,47B	0,37B
Testemunha	1,90A	1,33A	2,76A

<sup>1</sup>Médias de três repetições entre a média de todos os frutos de amoreira, framboeseiro e mirtilheiro, colhidos durante sete semanas de análise.

Dados que não seguem da mesma letra na coluna diferem entre si pelo teste de DMS de Fisher a 5 % de probabilidade de erro. CV = 17,44%

As enzimas produzidas pelos dois isolados em co-inoculação podem ter reagido sinergisticamente inibindo a germinação de esporos de *B. cinerea* à campo como diferindo das afirmações de Lorito *et al.*, (1993), que observaram esta inibição *in vitro*, bem como

induzindo ao rompimento das paredes celulares do patógeno, vindo de encontro as afirmações de Mamarabadi *et al.*, (2004).

#### 4. CONCLUSÕES

Nas condições em que este experimento foi conduzido é possível afirmar que:

-A co-inoculação de *T. asperellum* com *C. rosea* em condições de campo para as três culturas sob manejo de produção orgânica em estudo, controlou o mofo cinzento demonstrando efeito sinérgico pelo controle superior ao exercido por inoculações dos antagônicos isolados.

-A co-inoculação de fungos pode ter efeitos positivos em controle biológico, na agricultura o que incita novos estudos.

## 6. CAPÍTULO II

### ISOLAMENTO DE FUNGOS DE SOLO ASSOCIADOS AS CULTURAS DE AMORA, FRAMBOESA E MIRTILO NO SUL DO BRASIL.

#### RESUMO

Os fungos de solo constituem inúmeras espécies, que sofrem alterações por diversos fatores. Dentre estes, é possível destacar o manejo e características químicas do solo utilizado no estabelecimento de diferentes culturas. Este trabalho objetivou o isolamento de fungos mais frequentes no solo associados a culturas de amora (*Rubus* sp.), framboesa (*Rubus idaeus*) e mirtilo (*Vaccinium* spp.) em manejo integrado e convencional, em Latossolo Bruno, na região de Vacaria, situada no nordeste do Rio Grande do Sul, Brasil. As amostras de solo foram coletadas sempre pela manhã, em quatro pontos da região, em quatro datas entre junho de 2008 e março de 2009. As amostras coletadas foram diluídas até  $10^{-3}$ , colocadas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio BDA acrescido de antibiótico e submetidas a incubação a 25°C com fotoperíodo de 12 horas por 7 dias. A maior incidência de fungos isolados pertence aos gêneros *Penicillium* sp e *Aspergillus* sp., do antagonista *Trichoderma* sp. e de fungos com coloração de colônia rosadas, indicativo da presença de antraquinonas que impermeabilizam e lesam células de *B. cinerea*. As colônias isoladas, foram comparadas quantitativamente quanto ao tipo de manejo a que estavam submetidas as plantas de origem. Os fungos candidatos a antagonistas e *Trichoderma* sp. foram isolados somente nos quatro solos, em cada uma das três culturas conduzidas com manejo integrado. *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. apareceram mais frequentemente em solos de todas as culturas, independentemente do manejo utilizado.

**Palavras-chave:** Fungos de solo. Isolamento. pequenos frutos.

## ABSTRACT

### ISOLATION OF SOIL FUNGI ASSOCIATED TO THE CULTURES OF BLACKBERRY, RASPBERRY AND BLUEBERRY IN SOUTHERN BRAZIL HIGHLAND

The soil fungi are numerous species that are altered by several factors. Among these we can point out the management and chemical characteristics of soil used in the establishment of different cultures. This work aimed the isolation of fungi in the soil frequently associated blackberry (*Rubus* sp), raspberry (*Rubus idaeus*) and blueberry (*Vaccinium* spp) in conventional and integrated management in Brown Latosols, in Vacaria, located in the northeast Rio Grande do Sul, Brazil. Soil samples were always collected in the morning at four points in four regions between June 2008 and March 2009. The samples were diluted to 10<sup>-3</sup>, placed in Petri dishes of 9 cm in diameter containing PDA medium plus antibiotics and subjected to incubation at 25 ° C with a photoperiod of 12 hours for 7 days. The highest incidence of fungi isolated belong to the genera *Aspergillus* and *Penicillium* sp, the antagonistic fungus *Trichoderma* sp. colored pink colony, indicating the presence of anthraquinones waterproof and damage to cells of *B. cinerea*. The isolated colonies were compared quantitatively on the type of management that were submitted to the source material. The candidates antagonistic fungi and *Trichoderma* sp. were isolated only in the four soils in each of the three cultures conducted with integrated management. *Penicillium* sp and *Aspergillus* sp appeared more frequently in soils of all cultures, regardless of management used.

**Keyword:** Soil fungi. Isolated. small fruit.



## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de frutas, entretanto com uma pequena participação no mercado internacional, cuja exportação vem aumentando aos poucos nos últimos anos com cadeias produtivas investindo em tecnologias buscando principalmente qualidade (REETZ, *et al.*, 2007). Os pequenos frutos conhecidos como berries, estão entre os sistemas de produção com franca ascendências nas regiões de maior altitude e clima frio do Brasil.

A amora (*Rubus fruticosus*) e a framboesa (*Rubus idaeus*) são frutos agregados ou mini drupas vermelhas (ANTUNES *et al.*, 2002), de plantas angiospermas dicotiledôneas, ordem das Rosales, família Rosácea e gênero *Rubus*, com reprodução vegetativa ou sexuada. A amora preta ou Tupi difundida em várias regiões do mundo que teve impulso no Brasil na década de 1970 destaca-se no momento atual, não só pelo sabor como também por seu poder terapêutico, rica em vitamina E, C, e substâncias antioxidantes (SALGADO, 2003).

A framboesa originária do hemisfério Norte que foi introduzida inicialmente em Campos do Jordão, SP, além de ser apreciada por seu sabor e perfume característico, é considerada antioxidante (SALGADO, 2003) e seus frutos vermelhos vêm sendo considerados de grande importância para estudos, como agentes produtores de substâncias químico preventivas contra o câncer (WARGOVICH, 2006).

O mirtilo (*Vaccinium* spp.) cujo fruto é uma baga de sabor agridoce, com cor que varia do azul claro ao azul escuro, é uma planta do tipo arbustiva, que pode alcançar desde alguns centímetros de altura a espécies de até 4m. Pertencente a família Ericaceae (PAGOT, 2006), reproduz-se por propagação de clones. Embora ainda pouco conhecida no Brasil, vem sendo uma boa alternativa para alguns pequenos produtores de algumas regiões sul e sudeste, por ser uma fruta muito apreciada não só pelo sabor exótico como também pelos poderes medicinais e alto valor econômico (ANTUNES, 2002), além de ampliar espaço para exportação.

A amora preta e a framboesa desenvolvem-se em quase todo tipo de solo, mas os solos ligeiramente ácidos com pH em torno de 5,5 a 6,0 são os melhores, enquanto que a temperatura mais fria é a preferida. Já o mirtilo oriundo do sul dos Estados Unidos requer um solo um pouco mais ácido com pH entre 5,0 e 5,5, poroso, normalmente com aplicação de

casca de pinus ou serragem em decomposição e uma necessidade baixa de frio, em torno de 600 hs anuais. O estabelecimento das mudas nos solos manejados para seu melhor desenvolvimento deve seguir fileiras simples, o que propicia facilidade em manejo posterior ao plantio e controle de doenças (PAGOT, 2006).

Na região sul do país os pequenos frutos encontraram situações favoráveis ao seu desenvolvimento, estando às áreas de maior cultivo concentradas nas regiões de Vacaria, Feliz e Pelotas (ANTUNES *et al.*, 2002). Segundo a EMATER/RS-ASCAR (2010), somente nos Campos de Cima da Serra, que compreendem os municípios de Vacaria, Campestre da Serra e Ipê, cujo solo e temperatura se ajustam bem as necessidades destes frutos o total de produção de amora preta passou de 380 toneladas em 2005 para 1972 toneladas em 2009; a framboesa de 45 a 81 toneladas e o mirtilo de 32 a 62 toneladas, respectivamente.

Estas culturas são atacadas por diversas doenças causadas por vários microrganismos patogênicos cuja incidência pode ser reduzida pelo manejo adequado estimulando a diversidade da microbiota associada, utilizando-a como instrumentos de biocontrole. Porém, a manutenção e o uso da biodiversidade com finalidades econômicas e sociais ainda é um desafio a enfrentar (MELO, 1996), embora o uso de microrganismos como agentes de controle biológico, com o objetivo de minimizar danos e prejuízos a cultivos agrícolas já venha sendo estudados ao longo do tempo (TRONSNO, 1991; ANDREWS, 1992; SUTON & YU, 1997; FORTES, 2007).

Muitos microrganismos se encontram concentrados no solo rizosférico devido ao aumento de disponibilidade de substrato (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). A exportação de nutrientes nas colheitas (NEVES & RUMJANECK *in* MELO & AZEVEDO, 1998) aliados a fatores químicos de manejo pode alterar o equilíbrio dinâmico destes microrganismos, sendo a perda da microbiota extremamente danosa, o que leva a desequilíbrios biológicos que podem determinar a extinção de algumas espécies de plantas e animais (MELO & AZEVEDO 1998). Vários microrganismos de solo apresentam reações de antagonismo a patógenos mantendo em equilíbrio estas populações.

O solo visto como um componente crítico na biosfera terrestre funciona não só como sistema de produção agrícola, mas também na manutenção da qualidade ambiental com efeito local e regional, podendo ser caracterizado como um corpo natural organizado, vivo e dinâmico que desempenha inúmeras funções no ecossistema terrestre (REETZ, 2007). O manejo do solo é, portanto sinônimo relacionado a sua fertilidade e extremamente importante quando se trata de microrganismos relacionados a diferentes culturas que se encontram neste. Esta enorme diversidade microbiana interligada entre si sofre em condições adversas que

podem ocasionar a seleção dos mais resistentes, determinando perdas de espécies importantes ao desenvolvimento destas culturas. Dentre os microrganismos de solo, a biomassa fúngica é predominante (KURAKOV *et al.*, 2008) e nela se encontram várias espécies com potencial antagônico e de promoção de crescimento, entre outros.

Fungos filamentosos do gênero *Penicillium* sp., produzem micotoxinas do tipo patulia, ocratoxina, citrinina, penitrina e ácido ciclopiazóico A; enquanto Fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, produzem micotoxinas do tipo aflatoxina B1, G1, M1, ocratoxina a, easterigmatocistina e ácido clicopiazóico (STEYN, 1995). Estas substâncias são consumidas de forma involuntária, tendo efeitos tóxicos para consumo em produtos agro-alimentares sendo ainda carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos, citotóxicos, neurotóxicos, nefrotóxicos e imunodepressores (ROBISON *et al.*, 2000). O crescimento destes fungos micogênicos e a produção de micotoxinas dependem das complexas relações existentes entre fungo, substrato e ambiente. Por outro lado, estes mesmos fungos quando presentes em solos corretamente manejados, sem excessos químicos, têm efeito positivo no desenvolvimento de culturas, como o fungo *Penicilium* sp estudado como promotor de crescimento (KOIKE *et al.*, 2001) e *Fusarium* sp usado como inibidor de germinação de conídios de *B. cinerea* (GULLINO, 2000; POHANKA, 2004). Além disto, os fungos destes gêneros apresentam capacidade de adsorção relativa de metais pesados em água e solos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006) e são capazes de solubilizar fosfatos (RAO *et al.*, 1983). Em relação aos nutrientes para as plantas, fungos do gênero *Aspergillus* estão envolvidos na mineralização de pequena quantidade de N- orgânico na forma de proteínas, peptídios, amidas e amidinas.

Espécies de *Trichoderma* são consideradas eficientes antagonistas contra uma série de fungos fitopatogênicos do solo (WELLS, 1988; MARTINS-CORDER & MELO, 1998 ; LISBOA *et al.*, 2007) usados na promoção de enraizamento (FORTES *et al.*, 2007), atuando tanto pela produção de compostos metabólitos, como antibióticos e enzimas extracelulares. Produzem compostos voláteis e não voláteis capazes de inibir o crescimento de uma série de fungos (DENNIS & WEBESTER, 1971 a, 1971 b) por competição por nutrientes, espaço e oxigênio (CHET, 1987). Considerado promotor de crescimento de plantas (BARNET & HUNTER, 1972) contribui na oxidação do enxofre (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006) sendo ainda usado em tratamento de sementes (CELAR & VALIC, 2005).

Habitante natural do solo, o fungo *Clonostachys rosea* pode viver saprofiticamente ou parasitando outros fungos como *B. cinerea* (MORANDI *et al.*, 2003), competindo por

nutrientes (NOBRE *et al.*, 2005; ZAMBONI-PINOTTI, *et al.*, 2005), sem causar sintomas de moléstia (SUTON, 1994).

Microrganismos usados em biocontrole estão sujeitos a diversos fatores abióticos que derivam de aspectos físicos, químicos ou fisiológicos do meio ambiente e que podem influenciar sua atuação no ecossistema. Dentre estes fatores podemos citar temperatura, luz, gases, pH, aeração, umidade e solo. A esporulação destes fungos é geralmente estimulada pela luz. A exigência de CO<sub>2</sub> é satisfeita sem maiores dificuldades, mas a luz só é disponível na superfície do solo.

Este fato restringe o crescimento de microrganismos fotolíticos verticalmente até os primeiros 15mm de profundidade do solo. Segundo Inglis *et al.* (1999) (citados por ONOFRE *et al.*, 2001) a luz visível possui efeito estimulante na reprodução dos fungos, não somente desencadeando a maturação dos primórdios reprodutivos, mas também aumentando o número das estruturas em valores absolutos, entretanto, este fator torna-se importante na fase final do processo. Tsai *et al.* (1992) afirmam que os efeitos exercidos sobre microrganismos podem sofrer variações de acordo com espécies dentre outros fatores, podendo alguns fungos iniciar o processo de esporulação na ausência de luz e outros na presença desta.

Este trabalho visou o isolamento e caracterização morfológica de fungos presentes em um Latossolo Bruno Distrófico, na região superficial da rizosfera, com cultivo de amora, framboesa e mirtilo, relacionando a frequência fúngica às condições químicas e ao manejo do solo.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO DE AMOSTRAGEM

O solo dominante na região de Vacaria é classificado como Latossolo Bruno Distroférico típico, sendo um solo bem intemperizado e ácido, exceto em poucos locais, como próximo às calhas dos rios (ALMEIDA, 2006), onde podem ser mais rasos. O clima da região é do tipo Cfb, segundo a classificação de Köppen, (C=mesotérmico úmido, f: chuvas bem distribuídas; b: temperatura do mês mais quente com média inferior a 22°C). A precipitação pluviométrica é acima de 1.538 mm, bem distribuída nos meses do ano, verão ameno com temperatura média para janeiro e fevereiro de 20°C e para os meses mais frios de junho e julho média inferior a 10°C (EMATER/RS- ASCAR, 2010). O clima úmido confere acidez aos horizontes superficiais do solo, devido a lixiviação e decomposição do material orgânico (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

### 2.2. CARACTERIZAÇÃO DOS POMARES AMOSTRADOS

As coletas de solo cultivados com plantas de amoreira, framboeseiro e mirtilheiro para análise de ocorrência fúngica na região dos Campos de Cima da Serra da cidade de Vacaria, RS, foram realizadas em quatro pontos em torno da sede ou ponto zero, escolhidos de modo a se obter uma boa representatividade do solo com estas culturas sob controle integrado e convencional da região, distribuídos da seguinte forma: Pontos A1R, F2R, distância 18 km, altitude de 950m; Pontos M3I, A4I ,F5I, distância 7 km , altitude de 957m; Pontos F6M, A7M, distância 19 km , altitude de 963m; Ponto M8V: distância 10 Km, altitude de 963m, conforme visualizado no mapa mostrado na figura 4.

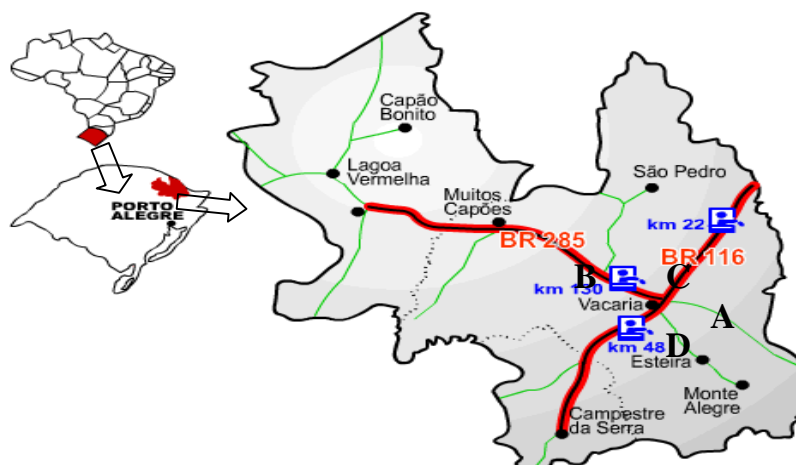


Figura 4 - Pontos de coleta de solo para isolamento de fungos mais frequentes em solos com culturas de amora, framboesa e mirtilo.

Vacaria sede: Ponto zero

A. Pontos A1R (i), F2R (c); distância 18 Km ; altitude de 950m.

B. Pontos M3I (c), A4I (i), F5I (c); distância 7 Km ; altitude de 957m.

C. Pontos F6M (i), A7M (c); distância 19 Km ; altitude de 963m.

D. Km 48- Ponto M8V (i); distância 10 Km; altitude de 963m.

Pomares de manejo convencional (c) Pomares de manejo integrado ou orgânico (i)

Os solos de cada ponto de coleta foram identificados por letras indicativas das culturas (A=Amora; F= Framboesa; M= Mirtilo) em estudo, antecedendo números de 1 a 8 que foram seguidos de letras de acordo com o local de implantação de cada cultura, sendo os pontos A1R, A4I e A7M cultivados com Amora Tupy; F2R, F5I e F6M cultivados com Framboesa Heritage e os pontos M3I e M8V cultivados com mirtilo Raibash Duck.

As culturas estabelecidas nos solos A1R, A4I, F6M e M8V, são anualmente tratadas com adubo orgânico oriundo de aviários, adubo foliar do tipo fosfito, sem utilização de defensivos químicos, definidas como pomares de cultivo integrado (i), enquanto as estabelecidas nos solos M3I, F5I, F2R e A7M, são tratadas com agrotóxicos (não relacionados pelos produtores), definidas como pomares de cultivo convencional (c).

### 2.3. ANÁLISES QUÍMICAS DO SOLO

Análises químicas das amostras de cada solo coletada foram realizadas pelo Laboratório de Rotina de Solos da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC), seguindo metodologias propostas por Tedesco, *et al.* (1995).

### 2.4. COLETA DE SOLO PARA ANÁLISE DE FUNGOS

Em cada ponto de coleta foram estabelecidos blocos compostos por fileiras, onde as plantas foram escolhidas de forma aleatória para cada coleta realizada a 10cm das raízes das plantas, utilizando cilindros de metal de 6 cm de diâmetro por 6 cm de altura identificados para cada solo, sendo um por parcela, tendo o cuidado de retirar anteriormente a cobertura orgânica, de modo a expor o solo abaixo desta. A amostragem foi realizada sempre em solo seco, com 4 dias após chuva, pela manhã, em quatro diferentes épocas (E) distribuídas nos meses de junho, outubro e dezembro de 2008 e fevereiro de 2009, sendo que as temperaturas do ar nestas datas foram de 6°C, 25°C, 26°C e 30°C, respectivamente.

As amostras obtidas foram mantidas em geladeira até o momento das análises em laboratório devido ao fato destas serem efetuadas em dia posterior ao da coleta.

## 2.5. QUANTIFICAÇÃO DE FUNGOS E ESTATÍSTICA

A quantificação de fungos das amostras de solo coletadas foi realizada através do método de diluição seriada. Esta consistiu na diluição progressiva de uma solução de cada amostra de solo coletada, em triplicata. Para isto foram utilizadas 9 gramas de solo suspensos em 90 mL de solução salina a 9% (9g de NaCl em 1L de H<sub>2</sub>O destilada e esterilizada). A solução obtida foi agitada por 10 minutos e diluída em água esterilizada em fator 10, dispondo posteriormente alíquotas de 0,1 mL da diluição de 10<sup>-3</sup> em placas de Petri esterilizadas, preparadas com o meio de cultura seletivo do tipo BDA (batata+ dextrose + agar) autoclavado, acrescido de antibiótico do tipo Streptomicina (0,3g para 500mL de água destilada e esterilizada). As placas foram levadas a estufa do tipo BOD, com fotoperíodo de 12 h, temperatura de 25°C por sete dias.

Após a retirada das placas da estufa o crescimento fúngico foi observado e as colônias surgidas em maior número, analisadas morfológicamente segundo Barnett & Hunter (1972) e quantificadas em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de acordo com Standart methods - método 9215 (2005) utilizando microscópio estereoscópio de 40 aumentos a partir de sua origem central possibilitando uma contagem mais fiel dentro da limitação imposta pela formação de micélios.

Como não foram feitas repetições das coletas em ano posterior, não há como analisar estatisticamente o efeito de épocas. Dessa forma, os valores foram transformados para escala logarítmica, para estabilizá-los  $-\ln(X + 1)$ , tornando possível demonstrar o comportamento de cada grupo, em cada época e local

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de microrganismos em um determinado solo é função das condições ambientais intrinsecamente relacionadas. A temperatura é um dos principais fatores que regulam a distribuição e permanência de um fungo no solo ou na parte aérea da planta. A temperatura média dos dias de coleta neste trabalho foi de 21,6°C o que propicia o desenvolvimento de fungos mesófilos como *Clonostachys*, *Fusarium*, *Tichoderma* e *Penicillium*. Estes gêneros apresentam espécies ocorrentes na maioria dos tipos de solo (MACHERONI *et al.*, in ESPOSITO & AZEVEDO 2004). Sendo as características biológicas influenciadas quando as amostragens são feitas em camadas superficiais do solo, onde as condições climáticas e de umidade sofrem variações.

Segundo Inglis *et al.* (1999) (citados por ONOFRE *et al.*, 2001) a luz visível nas camadas superficiais possui um efeito estimulante na reprodução dos fungos, onde ocorre maior atividade microbiana devido ao constante depósito de material orgânico sobre o solo (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006), o que favorece *C. rosea* (VICINE, 2004). Esta premissa foi respeitada neste trabalho, sendo a coleta feita na camada superficial do solo.

Mesmo sob acidez existente na região, a biomassa microbiana se encontra adaptada, sendo inibida apenas com pH 2,0 e 3,0 considerado muito baixo, o que pode ser determinado por alto teor de alumínio. Os solos A1R e F2R apresentaram pH acima da necessidade das plantas por terem sido calcareados anteriormente a implantação dos pomares sem controle agrônômico. Os demais solos apresentam pH de acordo com as necessidades das culturas implantadas (tabela 2). Nos solos analisados, neste trabalho, o pH ficou em torno de 4,8 a 7,0. Esta ampla faixa possibilita tanto fungos acidófilos como espécies de *Trichoderma* spp (PAPAVIZAS, 1985) como os fungos que se desenvolvem melhor em solos com pH próximos a neutralidade ou levemente alcalinos como *C. rosea*, ambos encontrados nas amostras de solo deste trabalho.



Tabela 2 - Caracterização química dos solos em estudo com culturas estabelecidas de amora, framboesa e mirtilo.

Amostra	pH	P	K	Na	M.O.	H + Al	Al	Ca	Mg
		mg/ dm <sup>3</sup>			%			cmol <sub>c</sub> / dm <sup>3</sup>	
A1R	7,0	43,9	151	9,0	4,0	0,6	0,0	10,7	6,3
F2R	7,0	80,0	578	15,0	6,4	1,0	0,0	11,0	7,0
M3I	4,8	>80	457	32,0	12,5	15,4	0,6	11,6	3,9
A4I	6,7	>80	600	65,0	8,8	2,5	0,0	12,4	6,5
F5I	6,6	52,5	560	18,0	5,9	2,5	0,0	11,3	6,6
F6M	6,1	0,8	354	10,0	5,3	1,7	0,0	6,6	3,6
A7M	4,8	1,3	97,0	5,0	4,2	2,5	0,4	3,5	2,1
M8V	5,2	44,0	181	10,0	3,9	7,0	0,0	6,0	3,5

\*O pH foi medido em H<sub>2</sub>O.

A maior incidência de fungos isolados, foi correspondente aos gêneros *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. e do antagônico *Trichoderma* sp. seguido de isolados candidatos com cor de colônia rosa indicativo da presença de antraquinonas (Tabela 3)

Tabela 3 - Total das quatro avaliações de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de fungos isolados de solo próximo a culturas de amora, framboesa e mirtilo e pH destes solos:

Unidades de coleta/ pH	Unidades formadoras de colônia (UFC- nº de fungos /g de solo)				
	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Clonostachys rosea</i> /candidatos	<i>Trichoderma</i> sp.	Outros
A1R pH 7,0	1,23 X 10 <sup>8</sup>	1,9 X 10 <sup>7</sup>	4,0 X 10 <sup>6</sup>	3,0 X 10 <sup>6</sup>	4,7 X 10 <sup>7</sup>
F2R pH 7,0	1,52 X 10 <sup>8</sup>	2,0 X 10 <sup>7</sup>	zero	zero	4,5 X 10 <sup>7</sup>
M8V pH 5,2	9,9 X 10 <sup>7</sup>	1,0 X 10 <sup>7</sup>	3,0 X 10 <sup>6</sup>	5,0 X 10 <sup>6</sup>	3,2 X 10 <sup>7</sup>
A4I pH 6,7	9,1 X 10 <sup>7</sup>	1,1 X 10 <sup>7</sup>	3,8 X 10 <sup>7</sup>	3,8 X 10 <sup>7</sup>	1,8 X 10 <sup>7</sup>
F6M pH 6,1	9,2 X 10 <sup>7</sup>	1,1 X 10 <sup>6</sup>	1,0 X 10 <sup>6</sup>	1,0 X 10 <sup>6</sup>	4,1 X 10 <sup>7</sup>
F5I pH 6,6	1,64 X 10 <sup>8</sup>	3,5 X 10 <sup>7</sup>	zero	zero	5,5 X 10 <sup>7</sup>
A7M pH 4,8	1,32 X 10 <sup>8</sup>	3,0 X 10 <sup>7</sup>	zero	zero	1,5 X 10 <sup>6</sup>
M3I pH 4,8	1,63 X 10 <sup>8</sup>	2,4 X 10 <sup>7</sup>	zero	1,0 X 10 <sup>4</sup>	4,0 X 10 <sup>6</sup>

É sabido que logo após a incubação em condições adequadas, cada célula viável dará origem a uma colônia de organismos. Os resultados estão expressos em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) embora sabendo que as células tendem a se agregar, formando micélio ou pseudomicélio, tornando difícil separar as unidades, sendo que uma UFC pode se originar de várias células (GALVAGNO & FORCHIASSIN *in* ESPOSITO & AZEVEDO, 2004).

Fungos do gênero *Aspergillus* vêm sendo isolados com frequência em áreas quentes, cultivadas e florestas tropicais (KLINCH, 2002). Neste trabalho mostraram o mesmo comportamento para todas as épocas de coleta evidenciando a diminuição de UFC somente em relação ao tipo de solo das amostras dos solos F6M, M8V e AR1 conduzidos com manejo integrado (Tabela 4 e Gráfico 1).

Tabela 4 - Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de fungos isolados de solo próximo a culturas de amora, framboesa e mirtilo em quatro datas de coleta:

Unidade de coleta	Datas de coleta	Fungos mais representativos avaliados (UFC) em quatro datas de coleta				
		<i>Penicillium</i>	<i>Aspergillus</i>	Isolados com colônia rosea	<i>Trichoderma</i>	Outros
A1R	Junho 08	1,4 X10 <sup>7</sup>	2,0X10 <sup>6</sup>	1,0X10 <sup>6</sup>	zero	9,0 X10 <sup>6</sup>
	Out 08	3,0X10 <sup>6</sup>	zero	1,0X10 <sup>6</sup>	zero	zero
	Dez 08	5,6X10 <sup>7</sup>	8,0X10 <sup>6</sup>	1,0X10 <sup>6</sup>	3,0X10 <sup>6</sup>	4,0X10 <sup>6</sup>
	Fev 09	5,0X10 <sup>7</sup>	9,0X10 <sup>6</sup>	1,0X10 <sup>6</sup>	zero	3,4X10 <sup>7</sup>
A4I	Junho 08	2,0X10 <sup>7</sup>	2,0X10 <sup>6</sup>	3,8 X10 <sup>7</sup>	zero	5,0X10 <sup>6</sup>
	Out 08	5,0X10 <sup>6</sup>	3,0X10 <sup>6</sup>	zero	zero	9,0X10 <sup>6</sup>
	Dez 08	6,5X10 <sup>7</sup>	4,0X10 <sup>6</sup>	zero	zero	2,0X10 <sup>6</sup>
	Fev 09	1,0X10 <sup>6</sup>	2,0X10 <sup>6</sup>	zero	3,8X10 <sup>7</sup>	2,0X10 <sup>6</sup>
A7M	Junho 08	1,0X10 <sup>7</sup>	4,0X10 <sup>6</sup>	zero	zero	7,0X10 <sup>6</sup>
	Out 08	3,0X10 <sup>6</sup>	5,0X10 <sup>6</sup>	zero	zero	7,0X10 <sup>6</sup>
	Dez 08	1,03X10 <sup>7</sup>	1,0X10 <sup>7</sup>	zero	zero	zero
	Fev 09	1,06X10 <sup>8</sup>	1,1X10 <sup>6</sup>	zero	zero	1,0X10 <sup>5</sup>
F2R	Junho 08	2,0X10 <sup>8</sup>	1,0X10 <sup>7</sup>	zero	zero	2,6X10 <sup>7</sup>
	Out 08	1,2X10 <sup>7</sup>	1,0X10 <sup>6</sup>	zero	zero	8,0X10 <sup>6</sup>
	Dez 08	1,06X10 <sup>8</sup>	1,02X10 <sup>7</sup>	zero	zero	1,0X10 <sup>6</sup>
	Fev 09	1,4X10 <sup>7</sup>	6,0X10 <sup>6</sup>	zero	zero	1,0X10 <sup>7</sup>
F6M	Junho 08	1,0X10 <sup>7</sup>	zero	zero	zero	2,7X10 <sup>8</sup>
	Out 08	1,7X10 <sup>7</sup>	zero	zero	zero	1,0X10 <sup>7</sup>
	Dez 08	5,8X10 <sup>7</sup>	zero	1,0X10 <sup>6</sup>	1,0X10 <sup>6</sup>	1,0X10 <sup>6</sup>
	Fev 09	7,0X10 <sup>6</sup>	zero	zero	1,0X10 <sup>6</sup>	2,0X10 <sup>6</sup>
F5I	Junho 08	1,2X10 <sup>7</sup>	2,0X10 <sup>6</sup>	zero	zero	3,5X10 <sup>7</sup>

Tabela 4. Continua.

Unidade de coleta	Datas de coleta	Fungos mais representativos avaliados (UFC) em quatro datas de coleta				
	Out 08	<i>Penicillium</i>	<i>Aspergillus</i>	Isolados com colônia rosea	<i>Trichoderma</i>	Outros
M8V	Dez 08	1,15X10 <sup>8</sup>	3,0X10 <sup>6</sup>	zero	zero	zero
	Fev 09	2,2X10 <sup>7</sup>	2,0X10 <sup>7</sup>	zero	zero	5,5X10 <sup>7</sup>
	Junho 08	3,0X10 <sup>7</sup>	5,0X10 <sup>6</sup>	zero	zero	2,1X10 <sup>7</sup>
	Out 08	5,0X10 <sup>6</sup>	zero	zero	zero	5,0X10 <sup>6</sup>
	Dez 08	6,3X10 <sup>7</sup>	1,0X10 <sup>6</sup>	3,0X10 <sup>6</sup>	2,0X10 <sup>6</sup>	5,0X10 <sup>6</sup>
	Fev 09	zero	zero	zero	3,8X10 <sup>7</sup>	zero
M3I	Junho 08	1,0X10 <sup>7</sup>	1,2X10 <sup>7</sup>	zero	zero	1,0X10 <sup>6</sup>
	Out 08	5,0X10 <sup>6</sup>	zero	zero	zero	2,0X10 <sup>6</sup>
	Dez 08	6,0X10 <sup>7</sup>	8,0X10 <sup>6</sup>	zero	zero	zero
	Fev 09	4,3X10 <sup>7</sup>	4,0X10 <sup>6</sup>	zero	1,0X10 <sup>4</sup>	1,0X10 <sup>6</sup>

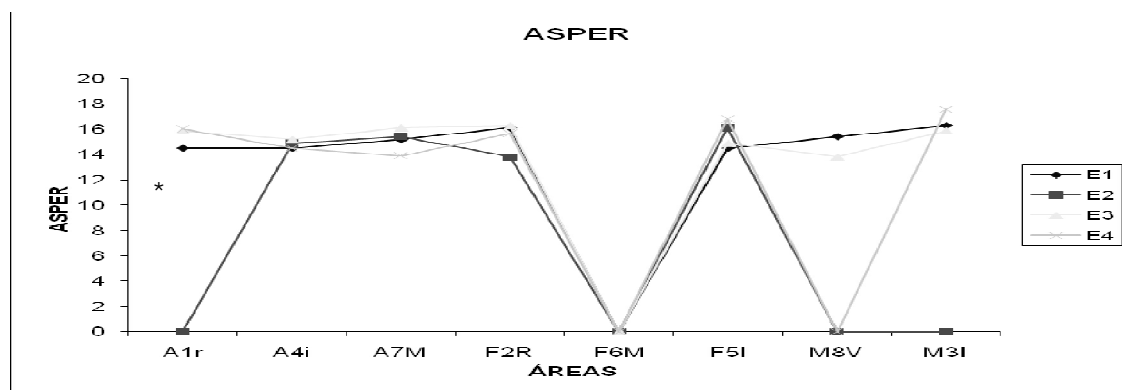


Gráfico 1 - Comportamento do fungo *Aspergillus* sp. em cada época e local de coleta.  
 Épocas e temperaturas: E1: 6 °C; E2: 25 °C; E3: 26 °C; E4: 30 °C \* n° de fungos /g de solo.

Na soma total de fungos coletados, o *Penicillium* sp. apresentou maior quantidade de UFC em relação aos demais, em todas as unidades de coleta exceto em M8V. A quantidade média deste fungo se mostrou constante nas avaliações das três culturas (Tabela 4 e Gráfico 2), podendo ser explicado pela presença de material orgânico nos solos amostrados. Para Kuter (1986), fungos como o *Penicillium* sp. e *C. rosea* predominam em processos de decomposição de serrapilheira, no caso, casca de pinus. Segundo Sutton *et al.* (1997), *Clonostachys rosea* é mais encontrado colonizando raízes, estames, folhas e sementes de plantas. Isto pode explicar a pouca incidência de colônias roseas candidatas a ser um tipo de *Clonostachys*, nas amostras de solo coletadas e somente em culturas de manejo integrado com maior deposição orgânica (Gráfico 2).

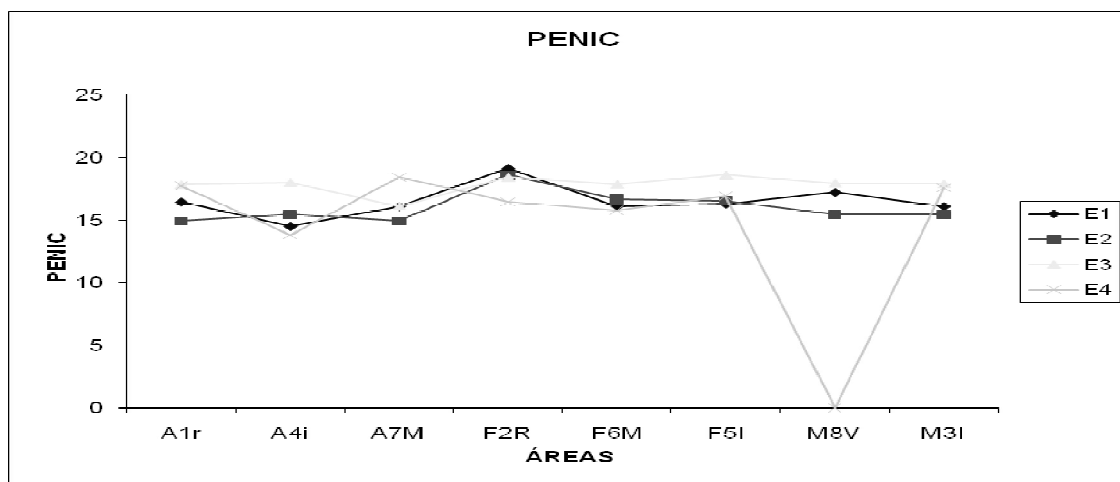


Gráfico 2 - Comportamento do fungo *Penicillium* sp. em cada época e local de coleta. Épocas e temperaturas: E1: 6 °C; E2:25 °C; E3: 26 °C; E4: 30 °C.

Nas amostras de solo correspondente aos pomares de amora, A1R e A4I, conduzidos por controle integrado, fungos róseas candidatos a *C. rosea* foram encontrados em alta concentração em todas as épocas de avaliação. Estes dois pomares não apresentaram sintomas de mofo cinzento causado pelo fungo necrotófico *B. cinerea*, podendo ser explicado pela continuidade de colonização de isolados candidatos. Os solos de controle convencional, não apresentaram isolados fúngicos rosados em todas as datas de coleta, que podem ter sido inibidos pelo uso de supressores microbianos utilizados pelos produtores. No cultivo de framboesa, estes fungos foram encontrados em F6M e em mirtilo no pomar M8V, ambos conduzidos com manejo integrado (tabela 4 e gráfico 3).

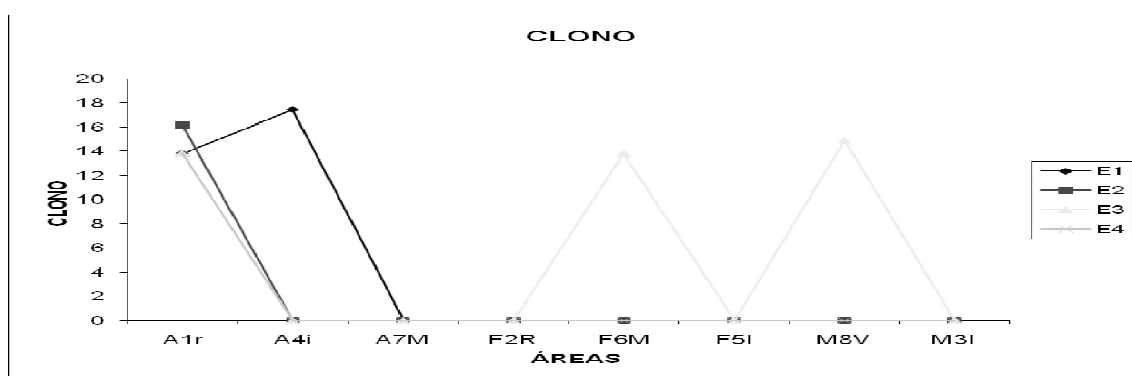


Gráfico 3 - Presença de colônias de fungos candidatos do tipo *Clonostachys* em cada época e local de coleta. Épocas e temperaturas: E1: 6 °C; E2:25 °C; E3: 26 °C; E4: 30 °C.

Segundo Maccheroni *et al.*, in Espósito & Azevedo (2004), *Trichoderma* sp. é um fungo comum. Neste trabalho aparece em todos os pomares de manejo integrado nas datas de maior temperatura. Nos pomares de manejo convencional aparece somente em M31 na data

de coleta de maior temperatura; porém, com menor incidência podendo ter sido inibido nos demais solos pelo uso de supressores microbianos (tabela 4 e gráfico 4).

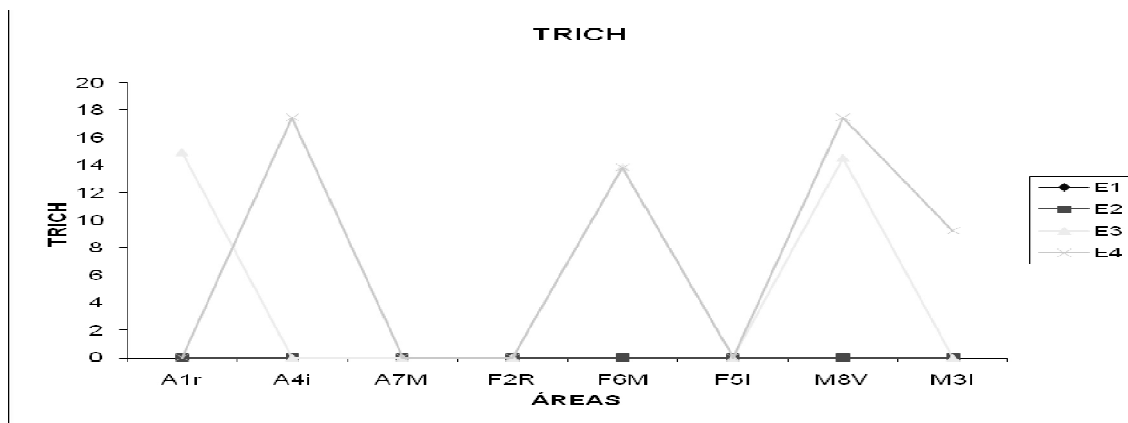


Gráfico 4 - Comportamento do fungo *Trichoderma* sp. em cada época e local de coleta. Épocas e temperaturas: E1: 6 °C; E2: 25 °C; E3: 26 °C; E4: 30 °C.

Baseado na distância euclidiana e método de agrupamento do vizinho mais distante das áreas e épocas, foi possível demonstrar em um dendrograma a similaridade entre as amostras: A menor distância entre amostras de mesmo local e época indicam uma maior similaridade entre elas, considerando todos os grupos conjuntamente (gráfico 5).

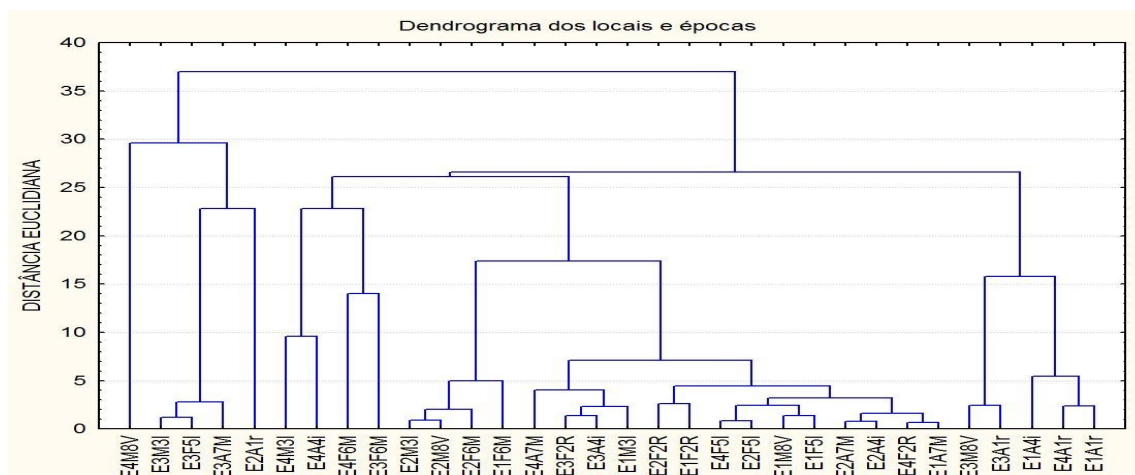


Gráfico 5 - Dendrograma baseado na distância euclidiana e método de agrupamento do vizinho mais distante, das áreas e épocas.

E: Época Locais: M31, M8V, A7M, A41, A1R, F2R, F51, F6M

### 3.1. RESUMO DOS RESULTADOS

- Fungos miceliais mais frequentes isolados das amostras de solo com culturas estabelecidas de amora, framboesa e mirtilo coletadas, foram caracterizados morfolologicamente como *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp. e isolados fúngicos com cor rósea de colônia indicativas da presença de antraquinonas.

- Os fungos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. são os isolados com maior frequência, sendo *Penicillium* sp. encontrado em todas as datas de coletas para todas as culturas, tanto em manejo integrado, quanto em manejo convencional, exceto em M8V.

- As diferentes temperaturas observadas no surgimento de isolados de *Trichoderma* sp. e isolados róseos candidatos a *Clonostachys* em todas as culturas, não parece ter tido influência sobre a quantidade de UFC em solos conduzidos com manejo integrado, durante o ano em que foram realizadas as coletas.

- Do solo M8V de manejo integrado e pH 5,2 foram isolados *Trichoderma* e candidatos somente nas temperaturas mais elevadas.

- O solo A1R com pH 7 conduzido com manejo integrado de amora, apresentou UFC de isolados candidatos em todas as coletas, independente da temperatura enquanto que para o solo A4I para a mesma cultura em manejo convencional este fungo só foi encontrado na menor temperatura de coleta não sendo encontrado em A7M com o mesmo manejo, porém com solo mais ácido.

- O solo F6M com cultura de framboesa conduzida por manejo integrado apresentou a menor incidência de *Trichoderma* e isolados candidatos em relação às culturas de amora e mirtilo.

- Os solos F51 e F2R com culturas de framboesas conduzidas por manejo convencional, não apresentaram *Trichoderma* e isolados candidatos em nenhuma data de avaliação.

#### 4. CONCLUSÕES

Nas condições de realização deste experimento é possível concluir que:

- Os antagonistas *Trichoderma* sp., bem como colônias de isolados rosados candidatos a *Clonostachys*, foram encontrados com maior frequência nos pomares conduzidos por manejo integrado nas culturas de amora, framboesa e mirtilo, independente da época de coleta.

## 7. CAPÍTULO III

### **AVALIAÇÃO DE ANTAGONISMO DE FUNGOS ISOLADOS OBTIDOS EM CULTURAS DE AMOREIRA, FRAMBOESEIRA, MIRTILEIRO CONTRA *Botrytis cinerea* EM LABORATÓRIO, CASA DE VEGETAÇÃO E A CAMPO.**

#### **RESUMO**

Estudos de isolamento de microrganismos da região rizosférica e da parte aérea de plantas como o fungo antagonico *Clonostachys rosea* a partir de morangos tem sido conduzidos visando o seu uso em biocontrole de *Botrytis cinerea* causador de mofo cinzento, por competição, micoparasitismo e antibiose. Outros fungos como *Fusarium* conhecidamente fitopatogênicos, são produtores de metabólitos tipo antraquinonas, pigmentos capazes de controlar *B. cinerea*. Sabendo que algumas espécies destes fungos apresentam *formae specialis* e não desenvolvem sintomas em plantas não suscetíveis ou ainda apresentam ciclo não patogênico, torna possível testar sua eficiência antagonica nestas plantas. Este trabalho se desenvolveu com o objetivo de avaliar *C. rosea* (GFO4) isolado de morangueiros pela EMBRAPA- Uva e Vinho e fungos isolados de solo na região rizosférica de amoreiras (A1, A4, A7, A17), framboeseiros (F2, F5, F6) e mirtileiros (M3 e M8) que apresentaram colônias de cor rosada podendo ser indicativo da presença do pigmento fúngico antraquinona. Estes isolados foram avaliados em testes de cultura pareada em laboratório e os que demonstraram maior antagonismo nesta fase além de ausência de sintomas em testes de fitopatogenicidade foram aplicados em tratamento preventivo contra *B. cinerea* em mudas de amoreira (*Rubus fruticosus*), framboeseiro (*Rubus ideaus*) e mirtileiro (*Vaccinium* spp.) estabelecidas em casa de vegetação. Os isolados A1, M3, M8 e GFO4, melhores antagonicos dessa fase, foram levados a campo para avaliação. O experimento foi conduzido em parcelas de cinco plantas para cada tratamento e cultura, em pomares comerciais do sul do Brasil. Foram inoculados por aspersão com  $10^6$  conídios/mL dos isolados duas vezes por semana durante toda a floração. Os resultados foram submetidos à análise estatística adotando-se um modelo linear de análise de variância por meio do teste DMS de Fisher, considerando o nível mínimo de significância de 5%. Todos os isolados apresentaram controle ao patógeno, porém M3 e M8 foram os melhores.

**Palavras Chave:** *Botrytis cinerea*. *Clonostachys rosea*. *Fusarium* sp. biocontrole. pequenos frutos.



**EVALUATION OF ANTAGONISM OF FUNGAL ISOLATES OBTAINED IN CULTURES OF MULBERRY, RASPBERRY AND BLUEBERRY AGAINST *Botrytis cinerea* IN THE LABORATORY, GREENHOUSE AND FIELD.**

**ABSTRACT**

Studies of microorganisms isolated from rhizospheric region and shoots of plants such as fungi antagonistic *Clonostachys rosea* from strawberries have been conducted to its use in biocontrol of *Botrytis cinerea* causing gray mold, by competition, and antibiosis micoparasitismo. Others fungi as known to phytopathogenic such as *Fusarium*, are producers of metabolites such anthraquinones, pigments able to control B. cinerea. Knowing that some species of fungi have speciall formae and do not develop symptoms in susceptible plants do not have cycle or non-pathogenic, its efficiency makes it possible to test these antagonistic plants. This work was developed with the aim of evaluating *C. rosea* (GFO4) isolated from strawberry by EMBRAPA-CNPUV and fungi isolated from rhizospheric soil in the area of mulberry trees (A1, A4, A7, A17), raspberry (F2, F5, F6) and mirtilleiros (M3 and M8) showed that colonies pink color may be indicative of the presence of fungal anthraquinone pigment. These isolates were evaluated on tests of paired cultures in the laboratory and those who showed greater antagonism at this stage and absence of symptoms in phytopathogenic tests were applied to preventive treatment against *B. cinerea* on seedlings of mulberry (*Rubus fruticosus*), raspberry (*Rubus ideaus*) and blueberry (*Vaccinium spp*) on greenhouse conditions. Isolates A1, M3, M8 and GFO4, antagonistic best of this phase were taken to the field. To evaluate the experiment was conducted on plots of five plants for each treatment and culture in commercial orchards in southern Brazil. Were sprays inoculated with  $10^6$  conidia / mL of isolated twice a week throughout flowering. The results were statistically analyzed by adopting a linear model analysis of variance by means of the DMS Fisher, considering the level of significance of 5%. All isolates showed the pathogen control, but M3 and M8 were the best.

**Keywords:** *Botrytis cinerea*. *Clonostachys rosea*. *Fusarium sp.* biocontrol. small fruits.

## 1. INTRODUÇÃO

Os cultivares comerciais de pequenos frutos como a amora, framboesa e o mirtilo oriundos da Europa, encontraram na região sul do país a potencialidade climática exigida por frutos de clima temperado, e por isso estabeleceram-se adequadamente a partir da década de 1990 (HOFFMAN *et al.*, 2005). Estas culturas servem de fonte de renda e melhoram a qualidade de vida de pequenos produtores (POLTRONIERE, 2003). Isto contribui para a manutenção de jovens no campo, o que reduz o cinturão de miséria de entorno das cidades. Estes frutos, conhecidos por seus altos teores de vitaminas, são atacados pelo fungo necrotrófico *Botrytis cinerea*, o qual ameaça a produção e a qualidade dos mesmos.

Este fungo amplamente difundido em regiões úmidas do planeta, afeta várias espécies de plantas em sistema de cultivo protegido (AGRIOS, 2004) e a campo. As folhas de culturas ainda jovens são infectadas e o fungo permanece em latência nas células da epiderme, até as condições ambientais se tornarem propícias ao início de seu desenvolvimento (BRAUM & SUTTON, 1987). Ataca ainda na produção de mudas e na fase de floração das plantas quando “sépalas e pétalas são infectadas e posteriormente o fruto invadido”, ocasionando o apodrecimento destes a campo e em pós-colheita, o que resulta em enormes perdas aos produtores ((SUTTON *et al.*,1997; COLEY *et al.*, 1980) e aumento do preço ao consumidor.

Em cultivo protegido, o manejo de *B. cinerea* integra práticas que vão desde a retirada de tecidos doentes, controle de temperatura e umidade relativa do ambiente até o uso de fungicidas e/ou biocontrole (SUTTON *et al.*,1997). A aplicação de fungicidas do grupo dos benzimidazóis, dicarboxinidas têm sido a principal forma de controle do mofo cinzento em sistema de cultivo protegido. Nestas condições de estufa em estufas os 6trabalhadores correm grave risco para a sua saúde pois atuam em condições de ambiente fechado de cultivo protegido.

No cultivo convencional de frutos como o morango (*Fragaria X ananassa* Duch.) a utilização excessiva de produtos químicos de ação não específica como os benzimidazóis e dicarboxinas e inibidores da síntese do ergosterol (REDMOND *et al.*,1987) tem contribuído para resultados negativos tanto na produção como na comercialização. Este processo vem a favorecer a seleção dos isolados mais resistentes do patógeno levando a reaplicações em nível

crescente, tendo como consequência destas aplicações na fase de floração, a diminuição da viabilidade do pólen e da formação do fruto () além de deixar resíduos tóxicos nas frutas.(KOVACH *et al.*, 2000; DIANEZ *et al.*, 2002; BOF, 2003).

Visando minimizar custos e impactos ambientais proporcionando frutos com ausência de resíduos químicos, métodos alternativos de controle vêm sendo propostos, dentre os quais se destaca o controle biológico por fungos antagonistas. (BHATT & VAUGHAM, 1962; BRAUM & SUTTON, 1987; REDMON *et al.*, 1987; PENG & SUTTON, 1991

Isolamentos de microrganismos na região rizosférica e de parte aérea de plantas têm sido conduzidos com o intuito de serem usados em estudos de biocontrole de *B. cinerea*. Fungos conhecidamente antagonistas a este patógeno como *C. rosea* isolado de morangueiro, vêm sendo utilizado em diversas culturas por vários autores (HANNUSCH & BOLAND, 1996; VALDEBENITO-SANHUEZA *et al.*, 1997; (HUANG *et al.*, 2000; NOBRE *et al.*, 2005; SILVERA-PEREZ, 2006) vem demonstrando capacidade de impedir o desenvolvimento de patógenos por produzirem metabólitos e/ou consumirem substrato.

Um fator positivo a ser considerado no que se refere à capacidade de *C. rosea* colonizar as culturas a serem protegidas (PARKE, 1991), refere-se ao fato de não apresentarem virulência nas culturas inoculadas (SUTTON, 1992; HARMAN *et al.*, 2004). A inoculação destes como agentes de controle biológico torna-os partes integrantes da microbiota já existente como componentes do ecossistema, embora seu destino no ecossistema não seja ainda bem conhecido (LONGA *et al.*, 2009). Porém a capacidade de permanência destes fungos no solo por longo período e em boa concentração demonstra característica adequada a um bom antagonista no biocontrole de patógenos. No controle biológico de *B. cinerea*, *C. rosea* vêm se destacando por colonizar o filopiano a partir da floração oportunizando a colonização da base nutritiva proveniente das partes florais senescentes, antes da chegada do patógeno (DUBOS & BULIT, 1979; BLAKEMAN & FOKEMA, 1982). Isso diminui a esporulação e retarda a disseminação do patógeno, reduzindo a produção das estruturas de sobrevivência (YOHALEM *et al.*, 2004).

No estudo do antagonismo, espécies de patógenos como *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. e *Fusarium solani* (Mart) Sacc. (ZAZZERINI & TOSI, 1985; ILLIPRONTI & MACHADO, 1993) vêm sendo usados no controle de *S. sclerotiorum*, um isolado de *Fusarium oxysporum* não patogênico é apontado por Fravel (2008) como biocontrolador de patógenos veiculados ao solo, com efeito supressor.

Microrganismos usados em biocontrole estão sujeitos a diferentes fatores abióticos que derivam de fatores físicos ou químicos ambiente e podem influenciar sua atuação no

ecossistema. O conhecimento das características dos agentes de biocontrole permite uma maior manipulação no que diz respeito a inoculação, seguindo as limitações impostas pelos fatores bióticos e abióticos, a fim de conseguir os efeitos positivos desejados no controle aplicado.

Esta pesquisa objetivou avaliar a capacidade de antagonismo a *B. cinerea* dos candidatos a antagonistas isolados de solo na região rizosférica de amoreiras; de framboeseiros e de mirtilheiros. A seleção dos melhores isolados foi inicialmente realizada em laboratório através de testes de cultura pareada e capacidade de colonização. Os melhores antagonistas selecionados em laboratório foram aplicados em tratamento preventivo contra *B. cinerea* em mudas de amoreira, framboeseiro e mirtilheiro estabelecidas em casa de vegetação, sendo que GFO4 e os melhores isolados foram testados a campo em tratamento preventivo, nestas culturas e o resultado comparado com os obtidos pela aplicação de GFO4 isolado de morangueiros pela EMBRAPA- CNPQV.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos em condições controladas foram conduzidos no laboratório de Microbiologia da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Lages, RS e no laboratório de microbiologia e na casa de vegetação da Universidade de Caxias do Sul, Campus de Vacaria (UCS), RS. Os experimentos a campo foram conduzidos em pomares sob manejo de produção orgânica certificada em Vacaria, RS.

### 2.1. OBTENÇÃO E PROPAGAÇÃO DE INÓCULOS

#### 2.1.1. Obtenção e preparo do inóculo do patógeno

Frutas de amoreira, framboeseira e mirtilheiro com sintoma de podridão cinzenta obtidos de diferentes cultivares, foram levadas à câmara asséptica para isolamento do patógeno com agulha histológica. O material colhido foi colocado na parte central de placas de Petri com meio de cultivo BDA (batata dextrose e Agar) estéril, sendo imediatamente vedadas com filme plástico e levadas a estufa de crescimento tipo BOD a 25 °C em luz constante por sete dias.

Após o crescimento das colônias, discos de 3mm de diâmetro das mesmas foram cortados com vazador de cortiça esterilizado e transferidas para placas com BDA esterilizadas e levadas novamente a incubação nas mesmas condições anteriores por mais sete dias. As colônias purificadas nesta etapa foram mantidas sob refrigeração a 4 °C.

Para as inoculações utilizadas nos experimentos, foram preparadas suspensões de conídios a partir das colônias mantidas a 4 °C. Os conídios foram suspensos em água destilada e esterilizada a uma concentração de  $10^6$  conídios/mL, com auxílio da câmara de Neubauer.

#### 2.1.2. Origem dos isolados candidatos a antagonicos

O isolado de *Clonostachys rosea* (GFO4) utilizado neste trabalho pertence à coleção da Embrapa Uva e Vinho (CNPUV), que foi obtido de morangos na serra gaúcha em trabalho feito por Dall'Onder *et al.* (2001), mantido sob refrigeração a 4 °C.

Os isolados candidato A1, A4, A7, A17, foram obtidos através de isolamento da região rizosférica de amoreiras; os isolados F2, F5, F6; de framboeseiros e os isolados M3 e M8 de mirtilheiros, em Vacaria RS, Brasil. Todos os isolados escolhidos, apresentaram colônias de cor rosada, o que segundo Mendonza, *et al.*, (2005), pode ser indicativo inicial da presença de antraquinonas.

### 2.1.3. Multiplicação dos fungos isolados e preparo dos inóculos

Para obtenção e multiplicação de colônias dos fungos candidatos refrigerados foram obtidos discos de 3 mm de diâmetro de cada colônia com vazador de cortiça esterilizado e colocados em placas de Petri contendo meio BDA estéril com adição de 5ppm de estreptomicina/Lde BDA, tornando o meio seletivo para fungos. As placas foram vedadas com papel plástico e levadas a incubação em estufa tipo BOD a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas, por sete dias. Após este período foram mantidas sob refrigeração de 4 °C.

Para as inoculações utilizadas nos experimentos de casa de vegetação foram preparadas suspensões de conídios a partir de lavagem com água destilada das placas colonizadas com os fungos candidatos. A água resultante foi filtrada em gase estéril que propiciou a retirada de estruturas fúngicas com exceção dos conídios a serem usados na suspensão. Os conídios foram suspensos em água destilada e esterilizada para obter uma concentração de  $10^6$  conídios/mL, ajustada após contagem em câmara de Neubauer.

## 2.2. ENSAIOS EM FOLHAS DESTACADAS

### 2.2.1. Origem e desinfecção do material vegetal

Foram utilizadas folhas de plantas de amora cv Tupi, de framboesa cv Heritage e de mirtilo cv Power Blue, estabelecidas em vasos de casa de vegetação.

Folhas de plantas foram desinfestadas em câmara asséptica, com método modificado de Bettiol (1991), que consistiu em mergulhar sequencialmente o material coletado em álcool 96° por 2 minutos, hipoclorito de sódio 2,5% por 3 minutos, e finalmente 3 enxágues com água destilada e esterilizada, sendo as folhas assim desinfetadas secas em papel toalha esterilizada.

### 2.2.2. Verificação do potencial antagônico dos fungos isolados em teste de cultura pareada

Colônias mantidas sob refrigeração foram utilizadas neste procedimento cortando-se discos de Agar colonizado com perfurador de cortiça de 0,5cm de diâmetro de cada candidato antagônicos e colocados em placas contendo BDA a 3cm de distância de um disco de igual diâmetro colonizado por *B. cinerea*. As placas foram levadas a estufa tipo BOD a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas por sete dias. Após este tempo, das colônias desenvolvidas foram retiradas discos de Agar da zona de intersecção do crescimento dos dois microrganismos e transferidos para meio BDA + Improdione 2ppm, para verificar o efeito do isolado antagônico no crescimento do patógeno. Como testemunha foi colocado na mesma placa um disco colonizado somente pelo patógeno. As placas foram levadas a BOD nas condições anteriores.

A avaliação do efeito antagônico ao patógeno pelos microrganismos isolados foi feita com a observação de três variáveis: 1) Sobrevivência do patógeno ou do antagonista em cultura pareada avaliada pela zona de inibição das colônias conforme inibição do crescimento das colônias de *B. cinerea*; 2) a relação antagonista-patógeno determinada pela escala de classes de Bell *et al.* (1982). Conforme esta escala, são conferidos graus de antagonismo sendo que em Grau 1 o antagonista cresce em toda a placa; grau 2, antagonista cresce em 2/3 da placa; grau 3, antagonista e patógeno dividem igualmente a placa; grau 4, patógeno cresce em 2/3 da placa e grau 5, patógeno ocupa toda a placa; 3) Observação microscópica de lâminas preparadas a partir do ponto de intersecção dos fungos analisados com observação da relação entre as estruturas do patógeno e candidatos. Todo o procedimento foi realizado em câmara asséptica em triplicata.

### 2.3. TESTE DE PATOGENICIDADE DOS ISOLADOS EM AMORA, FRAMBOESA E MIRTÍLO

Os isolados A1 e A17 de amoreira e M3 e M8 de mirtilheiro, que demonstraram melhor antagonismo a *B. cinerea* em testes de cultura pareada, foram submetidos a testes de patogenicidade nas de amora, framboesa e mirtilo.

Treze plantas de cada cultura foram estabelecidas em vasos de 5 kg de solo corrigido para serem inoculadas.

Para o preparo dos inóculos, placas de Petri de cada um dos isolados que estavam sendo mantidas sob refrigeração sofreram a adição de 5mL de água estéril em cada uma, com conseqüente raspagem das colônias que foram filtradas em gase e adicionadas a 100 mL de água destilada e estéril, de modo a se obter uma concentração de inóculo de  $10^7$  conídios mL<sup>-1</sup> por planta.

Cada inóculo foi aplicado no solo e parte aérea de três plantas de cada cultura por aspersão, e uma testemunha por cultura foi aspergida apenas com água estéril. O volume utilizado por planta foi de 100 mL. As plantas inoculadas foram mantidas em condições controladas de laboratório com temperatura média de 22°C e umidade constante por 30 dias.

A avaliação após este período, consistiu na dessecação de toda a planta observando o surgimento ou não de sintomas de doenças fúngicas da parte radicular, dos vasos e da parte aérea de cada planta. A observação foi realizada com auxílio de lupa estereoscópica e microscópio óptico e crescimento em meio de cultura.

## 2.4. ESTUDO EM CASA DE VEGETAÇÃO

### 2.4.1. Instalação dos experimentos

Plantas de amora, cv Tupi, framboesa, cv Heritage e mirtilo, cv Power Blue foram cultivadas em casa de vegetação. Utilizou-se 24 mudas de cada cultura estabelecidas em vasos de 5 litros de volume cada uma (Figura 5). O solo foi corrigido com 5 kg por m<sup>3</sup> de adubo orgânico com as seguintes características: pH 7, 1% de nitrogênio (N) total, 3,2% de fósforo (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), 1,2% de potássio (K<sub>2</sub>O), num total de 5,4% de NPK, com umidade determinada em 65 °C. O adubo foi incorporado ao solo juntamente com vermiculita e receberam uma cobertura de casca de pinus envelhecida.



Figura 5 - Mirtileiros estabelecidos em casa de vegetação.

O delineamento experimental consistiu de plantas divididas em seis parcelas de mudas de plantas de cada frutífera, sendo uma planta para cada tratamento em três repetições, as



quais foram mantidas úmidas por meio molhamento automático de jatos por aspersão por 10 minutos diários.

#### 2.4.2. Descrição dos tratamentos

As culturas de amoreira, framboeseiro e mirtilheiro mantidas em casa de vegetação foram submetidas aos tratamentos com os isolados antagonistas A1, A17, M8, M3 e GFO4 por suspensão de conídios preparados a partir de placas colonizadas aplicadas com aplicador do tipo spray na parte aérea e no solo de cada vaso e para cada parcela e cultura, duas vezes por semana durante três meses, na dose de 100mL por planta a cada aplicação

#### 2.4.3. Avaliação para as três culturas em casa de vegetação

Para a avaliação dos tratamentos foram colhidas ao acaso três folhas jovens e de aparência sadias de cada cultura e repetição, as quais foram submetidas a desinfestação superficial e colocadas em bandejas plásticas de 30cm x 50cm x 8cm forradas com papel toalha, cobertas por tela plástica de malha fina tipo sombrite, sendo todo o material previamente esterilizado. A seguir as folhas das plantas tratadas foram pulverizadas com uma suspensão de  $10^6$  conídios/mL por planta, obtida através dos isolados de *B. cinerea*, exceto a testemunha. As bandejas contendo as folhas foram cobertas por sacos plásticos e mantidas em estufa tipo BOD a 21°C com fotoperíodo de 12 horas por quatro dias.

Após este tempo, de cada folha foram cortados discos de 1cm de diâmetro com perfurador manual, em três repetições. Os discos cortados foram colocados em placas de Petri e levados a freezer a -10°C por 30 minutos conforme metodologia desenvolvida por Zamboni-Pinotti & Valdebenito-Sanhueza (2007), como uma alternativa ao uso do agente ativo paraquat em laboratório usado para destruir os tecidos folhares revelando endofíticos. Na sequência os discos foram colocados em placas de Petri contendo meio BDA e levadas a estufa tipo BOD a 20°C com fotoperíodo de 12 horas por sete dias. Posteriormente registrou-se a colonização dos discos de folhas pelo patógeno ou antagonista, pela estimativa de áreas colonizadas, adaptando-se a metodologia descrita por Dall'Onder *et al.* (2001), que consiste em comparação com disco setorizado em porcentagens. A observação de micélio foi feita com auxílio de microscópio estereoscópico.

As análises estatísticas de discos de folhas das plantas tratadas em casa de vegetação foram conduzidas adotando-se um modelo linear de análise de variância. As comparações

entre os valores médios, de cada uma das variáveis nos diferentes tratamentos foram efetuadas por meio do teste DMS de Fisher. Para atenderem-se as pressuposições teóricas dos testes, em algumas variáveis foi adotada a transformação raiz quadrada e em outras a transformação arco-seno. Todas as transformações foram efetuadas conforme sugeridas pela análise descritiva dos dados. Porém, os resultados são apresentados na escala original. Para todos os testes efetuados foi considerado o nível mínimo de significância de 5%.

## 2.5. TRABALHO REALIZADO A CAMPO

### 2.5.1. Origem e conservação dos isolados antagonistas

Para este trabalho, foram utilizados os isolados A1, A17, M3, M8 e GFO4 como fungos antagonistas como tratamentos. Para obtenção e multiplicação de colônias dos fungos antagonistas resfriados, foram cortados discos de 3mm de diâmetro com vazador de cortiça esterilizado e colocados em placas de Petri com meio BDA estéril e estreptomicina, seletivo para fungos. As placas foram vedadas com filme plástico e levadas a incubação em estufa tipo BOD a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas, por 7 dias. Após este período foram mantidas novamente sob refrigeração de 4 °C até o momento de uso.

Os conídios, para produção de inóculo utilizado em testes a campo foram produzidos a partir de grãos de trigo conforme metodologia adaptada de Valdebenito-Sanhueza & Dall'Onder (2007), que consiste em grãos embebidos em água destilada por 6 horas, fervidos por 15min, colocados em frascos plásticos de 1L ocupando 20% do volume destes, com tampas rosqueadas com pequena abertura na parte central fechadas com algodão e papel alumínio e autoclavados por 30min. Para inocular os grãos estéreis foram utilizados 5 mL de suspensão aquosa com  $10^7$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  de cada um dos isolados e ajustadas após contagem em câmara de Neubauer, as tampas foram fechadas e vedadas com filme plástico. Os frascos foram colocados em posição horizontal, perpendiculares a uma fonte de luz em temperatura de 22 °C por 7 dias. Após este tempo os frascos foram agitados novamente e recolocados nas condições anteriores por mais 30 dias.

Depois de colonizados, os grãos foram mantidos nos frascos sob refrigeração de 4°C até o momento do preparo do inóculo, o isolado foi preparado a partir da lavagem de 2g de grãos com posterior filtragem em algodão estéril, em 4 L de suspensão aquosa ajustado na concentração de  $10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ .

### 2.5.2. Estabelecimento dos experimentos em cultivo comercial

Foram utilizadas neste trabalho plantas de amora da cultivar Tupi, framboesa da cultivar Heritage e mirtilo da cultivar Raibash Duck, sendo escolhidas trinta e cinco plantas de amoreira da cultivar Tupi com 11 anos de produção, trinta e cinco plantas de mirtilheiro do cultivar Raibash Duck com 8 anos de produção e trinta e cinco plantas de framboeseiro da cultivar Heritage com 6 anos de produção. Todas no espaçamento de 3,00 m X 0,30 m entre fileiras e plantas. Para cada tratamento com os isolados antagonistas e testemunha foram escolhidas quatro plantas ao acaso para cada repetição.

O pomar onde estas culturas estão estabelecidas apresenta Latossolo Bruno distroférico típico da região dos Campos de Cima da Serra, RS, Brasil situado a 7 Km do ponto zero da cidade em uma altitude de 957 m. Este pomar detém selo de produção orgânica e de qualidade de exportação. A aplicação de calda sulfocáustica cessou 1 mês antes da floração e início dos tratamentos com os antagonistas candidatos utilizados neste trabalho.

### 2.5.3. Descrição dos tratamentos e avaliação para as três culturas em cultivo comercial

Suspensão de conídios antagonistas foi preparada a partir de grãos de trigo colonizados com os isolados GFO4, A1, A17, M8 e M3 acrescidos de 0,01 mL de espalhante adesivo a cada 100 mL de inóculo. A testemunha recebeu somente água destilada.

As aplicações foram realizadas por aspersão de 1 L de inóculo por planta, usando aplicador do tipo spray na parte aérea das plantas de cada parcela e cultura duas vezes por semana, sempre no final da tarde, a partir da pré floração até a colheita dos frutos. Em amoreira e mirtilheiro foram realizadas 10 aplicações dos tratamentos antes da primeira avaliação enquanto que em framboeseiro foi iniciada a colheita após a 6ª aplicação. Para esta avaliação observou-se o surgimento de sintomas de mofo cinzento nas três culturas comerciais que receberam tratamentos com isolados candidatos. Os frutos para as avaliações colhidos das três plantas centrais de cada cultura considerada, realizada a cada quatro dias a partir do início da colheita totalizaram sete avaliações até o final desta. De cada planta considerada foram colhidos sete frutos colocados em bandejas separadas por tratamento e repetição sendo cobertas com saco plástico e deixadas em condições de prateleira à temperatura ambiente por quatro dias. Após este tempo cada fruto foi observado sob microscópio estereoscópico, para a identificação de sinais de podridão cinzenta. As condições climáticas dos dias de cada colheita foram fornecidas pelo INMET (Instituto Nacional de

Meteorologia, 2010).

#### 2.5.4. Análises Estatísticas

As análises estatísticas de discos de folhas das plantas tratadas em casa de vegetação bem como de número de frutos tratados a campo foram conduzidas conforme o delineamento experimental e o esquema de amostragem utilizado em cada um dos experimentos, adotando-se um modelo linear de análise de variância. As comparações entre os valores médios, de cada uma das variáveis nos diferentes tratamentos foram efetuadas por meio do teste DMS de Fisher. Para atenderem-se as pressuposições teóricas dos testes, em algumas variáveis foi adotada a transformação raiz quadrada e em outras a transformação arco-seno. Todas as transformações foram efetuadas conforme sugeridas pela análise descritiva dos dados. Porém, os resultados são apresentados na escala original. Para todos os testes efetuados foi considerado o nível mínimo de significância de 5%.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1. ANTAGONISMO EM MEIO DE CULTURA

Os isolados A1, A4, A7 e A17 de amoreiras; F2, F5 e F6 de framboeseiros e M3 e M8 de mirtilheiros, diferiram entre si na ação antagonista a *B. cinerea*.

A sobrevivência do patógeno ou do candidato antagonista em cultura pareada, avaliada pela zona de inibição das colônias está disposta no quadro 1. Observa-se que os isolados A1, A17, M3 e M8 inibiram o crescimento de *B. cinerea* acima de 80%.

Crescimento%	Isolados candidatos antagonistas								
	A1	A4	A7	A17	F2	F5	F6	M3	M8
Crescimento dos isolados	100*	0	0	80	0	0	0	100	100
Crescimento de <i>B.cinerea</i>	0	100	100	0	100	100	100	0	0

Quadro 1 - Sobrevivência do patógeno ou do antagonista em cultura pareada avaliada pela zona de inibição (%).

\* Média de sete repetições. Os resultados devem ser observados entre linhas comparando candidato antagônico e patógeno.

A capacidade antagonista obtida em cultura pareada através da relação patógeno/isolado candidato que foi medida pelo crescimento das colônias determinada pela escala de classes de Bell *et al.* (1982) pode ser indicativo de antibiose e pode ser observada no quadro 2.

Isolados	A1	A4	A7	A17	F2	F5	F6	M3	M8
Graus	1*	5	5	3	5	5	5	2	2

Quadro 2 - Capacidade antagônica a *B. cinerea* dos antagônicos candidatos isolados em cultura pareada medida pela escala de classes de Bell *et al.* (1982).

\* Média em sete repetições. Classes de Bell *et al.* (1982): Graus: 1) antagonista cresce em toda a placa; 2) antagonista cresce 2/3 da placa; 3) antagonista e patógeno dividem igualmente a placa; 4) patógeno cresce 2/3 da placa; 5) patógeno ocupa toda a placa.

Os nove fungos isolados com a característica cor rosa de colônia, quando testados em

cultura pareada, demonstraram antagonismo a *B.cinerea* quanto a avaliação de zona de inibição, entretanto somente A1, A17, M3 e M8 foram capazes de desenvolverem-se nesta zona. O isolado A1 em repique da zona de inibição desenvolveu-se completamente alcançando o diâmetro total da placa (9cm) em sete dias, enquanto os isolados M3 e M8 apresentaram colônias menores neste período com diâmetro médio de 7cm para M3 e 6,4 para M8. Embora as colônias de A17 tenham apresentado maior desenvolvimento em relação ao patógeno, não o inibiram completamente. A expansão micelial é uma característica de bom antagonico segundo Fokema (1993) e Punja & Utkhede (2003) e isto se confirma na avaliação de antagonismo da zona de inibição medida pela escala de classes de Bell *et al.* (1982). Nesta escala, o isolado A1 obteve classe 1, enquanto os isolados A4, A7, F2, F5 e F6 que não sobreviveram ao patógeno em repique de zona de inibição, obtiveram classe 5.

Quando os pontos de intersecção em cultura pareada foram fotografados através de microscopia óptica, hifas de A1, A17, M3 e M8 mostraram competição e parasitismo em hifas de *B. cinerea*, corroborando com Azevedo (2003) que afirma que uma característica recomendável para um candidato antagonico é que tenha mais de um mecanismo de antagonismo, como supressão de esporulação, parasitismo, antibiose ou indução de resistência.

Os pontos de intersecção das colônias fúngicas de M3 (Figura 6) e M8 (Figura 7) observadas em microscopia óptica foram comparados com resultados obtidos em microscopia eletrônica de varredura de GFO4 e *B.cinerea*, em cultura de amoreira (Zamboni Pinotti, 2005).

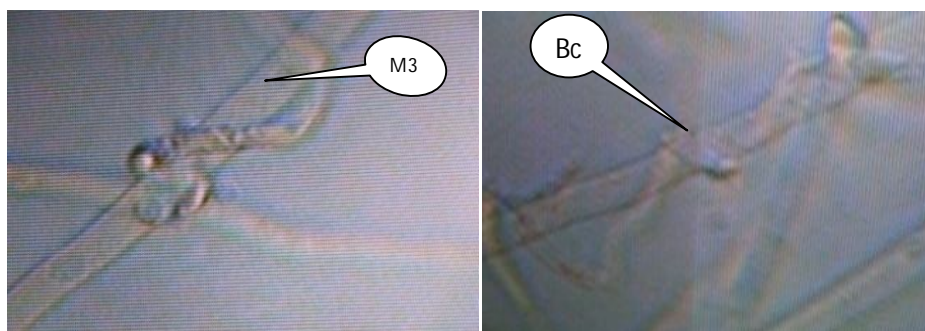


Figura 6 - Micoparasitismo do isolado M3 sobre o fitopatógeno *B. cinerea*.



Figura 7 - Micoparasitismo do isolado M8 sobre o fitopatógeno *B. cinerea*.

Bettiol (1991) citando Wody & Tveit (1955) reafirma que um bom antagonista deve ter rápida colonização. Baseado nesta premissa, somente os isolados que apresentaram resultados positivos de desenvolvimento de colônia em cultura pareada foram testados em tratamentos realizados em amoreiras, framboeseiros e mirtilheiros estabelecidos em casa de vegetação. Além destes utilizou-se o isolado GFO4 como ponto de comparação da eficácia do antagonismo exercido pelos isolados de solo obtidos como eficientes antagonistas.

### 3.2. ANÁLISE DE FITOPATOGENICIDADE

As plantas inoculadas com os isolados A1, A17, M3 e M8 mantidas em condições ideais para desenvolvimento de fungos em laboratório foram analisadas quanto ao surgimento de sintomas de doenças fúngicas em suas estruturas. Embora a cor das colônias envolvidas, nestes ensaios, possa ser encontrada em diferentes fungos que podem ser conhecidamente antagonistas como *C. rosea* ou patogênicos como *Fusarium* sp., as plantas analisadas não apresentaram sintomas de infecção.

Melo & Azevedo (2000) observam que *F. oxysporum* invade o sistema radicular de plantas hospedeiras, inibindo seu crescimento por ocasionar podridões de raízes e de partes dos vegetais em contato com o solo. Em estágio inicial de desenvolvimento de plantas, quando não impede a germinação, pode ocasionar rápida desidratação do hipocótilo acima do solo com colapso e morte da planta hospedeira. Uma característica sintomática deste patógeno é a coloração de cor escura (preta e marrom) do hipocótilo e o sistema radicular que permanece próximo à superfície do solo. A ausência destes sintomas nas plantas inoculadas em laboratório com os fungos isolados pode ser indicativo de que estes sejam antagonistas naturais, sugerindo a intensidade de *C. rosea* ou *Fusarium* sp. não virulento. Este fungo pode estar em forma perfeita de ciclo saprofítico na qual não desenvolve doença ou/e ainda apresentar *Formae specialis* (f.sp) que segundo Balmer (1978) pode determinar uma certa

especificidade por determinadas plantas não apresentando sintomas em outras. Trabalhos posteriores de sistemática devem ser realizados para determinar a identidade de tais isolados.

### 3.3. ANTAGONISMO DOS ISOLADOS A *Botrytis cinerea* AVALIADO EM FOLHAS DESTACADAS DE PLANTAS SUBMETIDAS A TRATAMENTO PREVENTIVO EM CASA DE VEGETAÇÃO

Esta etapa do trabalho utilizou os fungos isolados de solo M3, M8, A1 e A17 que demonstraram antagonismo em cultura pareada e o padrão isolado GFO4. Os resultados da comparação em folhas destacadas de plantas de amoreira, framboeseiro e mirtilheiro, quanto ao efeito dos tratamentos preventivos a *B. cinerea* aplicados nas plantas destas culturas, crescidas e tratadas em casa de vegetação e avaliadas quanto a colonização da parte aérea das plantas pelos antagonísticos selecionados e pelo patógeno, após aspersão deste, estão demonstrados nas tabelas 5 e 6.

Os isolados inoculados em tratamentos preventivos em amoreira, framboeseiro e mirtilheiro em casa de vegetação, permitiram comparar a eficácia de colonização destes em discos de folhas destacadas das três culturas (Tabela 5) e a infecção destes por *B. cinerea* (Tabela 6).

Tabela 5 - Discos de folhas de amoreira, framboeseiro e mirtilheiro colonizados por fungos candidatos antagonistas e o isolado GFO4 em tratamentos preventivos em casa de vegetação.

Tratamentos	Discos de folhas colonizados por isolados antagonistas <sup>1</sup> (%)		
	Amoreira	Framboeseiro	Mirtilheiro
GFO4	53 C	99 A	100 A
M8	99 A	100 A	100 A
A17	13 D	53 B	78 BC
A1	78 BC	100 A	74 C
M3	92 AB	100 A	96 AB
Testemunha	1 D	55 C	10 D
C.V. (%)	20,07		

<sup>1</sup>Médias de três repetições. Dados que não seguem da mesma letra na linha e coluna diferem entre si pelo teste de DMS de Fisher a 5% de probabilidade de erro.



Tabela 6 - Análise da variável porcentagem de discos de folhas de amoreira, framboeseiro e mirtilheiro colonizados com *Botrytis cinerea* após os tratamentos preventivos aplicado em casa de vegetação.

Tratamentos	Discos de folhas colonizados por <i>Botrytis cinerea</i> <sup>1</sup> (%)		
	Amoreira	Framboeseiro	Mirtileiro
GFO4	8 BC	1 CD	0 C
M8	4 BC	1 CD	0 C
A17	14 B	24 B	23 B
A1	17 B	8 BC	7 BC
M3	1 C	0 D	1 C
Testemunha	62 A	71 A	99 A
C.V. (%) 56%			

<sup>1</sup>Médias em três repetições. Dados que não seguem da mesma letra na linha e coluna diferem entre si pelo teste de DMS de Fisher a 5% de probabilidade de erro.

A eficácia do estabelecimento e antagonismo destes tratamentos feito pela observação do percentual de discos colonizados de folhas destacadas de plantas tratadas pelos antagonistas em casa de vegetação e inoculadas pelo patógeno em laboratório demonstrou que os isolados, M3 e M8 tiveram maior capacidade de estabelecimento e também apresentaram menor esporulação do patógeno em amoreira, porém não diferindo significativamente de plantas tratadas com o isolado A1.

Para as folhas de framboeseiro, o isolado A17 obteve o menor percentual de colonização em relação aos demais isolados com diferença significativa destes que apresentaram maior percentual de colonização em relação ao patógeno (Tabela 5). Mesmo com baixo percentual de colonização em relação aos demais, diferiu significativamente da testemunha.

Para as folhas de mirtilheiro, os isolados M3 e M8 apresentaram os melhores níveis de colonização não diferindo de GFO4. Embora os isolados A1 e A17 tenham apresentado um menor índice de colonização em relação aos anteriores, estes também diferiram da testemunha.

As variações observadas quanto a capacidade de colonização dos isolados nos diferentes hospedeiros podem, segundo Nobre *et al.* (2005), estar associadas às características das plantas, à sucessão microbiana na superfície das folhas e às mudanças morfológicas no desenvolvimento foliar, o que se observa quando se trata culturas diferentes.

Outro fato que se deve considerar para a elevada colonização dos isolados candidatos

é a forma pela qual os tratamentos foram aplicados nas plantas em questão estabelecidas em casa de vegetação. A aplicação preventiva, segundo Zang *et al.* (1996), Yu & Sutton, (1997), Zamboni- Pinotti (2004) e Valdebenito-Sanhueza *et al.* (2007), é a forma desejável quando se procura competidores de fungos que possuem fase quiescente e/ou sejam necrotróficos nas folhas como o *B. cinerea*.

A aplicação de  $10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  de *C. rosea* foi eficaz em controle de mofo cinzento em morangueiro (SUTTON & PENG, 1993), roseira (MORANDI *et al.*, 2001) e foi repetida com os isolados candidatos aplicados de forma preventiva nesta fase do trabalho.

Sabendo que o fungo necrotófico *Botrytis cinerea* pode sobreviver e esporular sobre restos culturais, os quais constituem fontes de substrato para o patógeno, o manejo da retirada dos restos de cultura que servem de base nutricional para início de infecção das plantas como material de manutenção de propágulos em dormência para patógenos como *B. cinerea* (BAKER & COOK, 1974; VALDEBENITO-SANHUEZA, 1991) foi realizado em condições de casa de vegetação. Este manejo que segundo Fokema (1993) e Punja & Utkhede (2003) possibilita a redução de substrato, propágulos, e severidade da doença, pode ter sido um dos fatores responsáveis pelo alto percentual de colonização dos isolados candidatos inoculados na concentração sugerida de  $10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  sobre as plantas consideradas, crescidas e tratadas em casa de vegetação, uma vez que puderam se estabelecer nestas culturas antes de entrarem em contato com *B. cinerea* em laboratório. Mas considerando que o nível de senescência dos restos de folhas simulados em casa de vegetação é menor do que aquele possibilitado em condições naturais se impõe limite na extensão dos resultados positivos obtidos, uma vez que a esporulação de *B. cinerea* à campo ocorre em maior quantidade.

#### 3.4. BIOCONTROLE DOS ISOLADOS SOBRE *Botrytis cinerea* EM CULTURAS COMERCIAIS DE AMOREIRA, FRAMBOESEIRO E MIRTILEIRO

Testes de antagonismo em folhas de plantas que estão crescendo sob condições controladas são a chave para seleção de agentes de biocontrole. Porém para Bettiol (1991), testes *in vitro* são pobres preditores da eficiência dos agentes de biocontrole *in vivo* por não simularem a diversidade e complexidade do solo e da superfície das plantas. Para atender a esta premissa, os isolados A1, M3, M8, melhores antagonísticos nos testes realizados em casa de vegetação, foram testados a campo, sob condições naturais quanto ao antagonismo a *B. cinerea* em culturas comerciais de amora, framboesa e mirtilo.

Em condições de campo os fatores que propiciam o aparecimento de *B. cinerea* nos

frutos são alta umidade relativa do ar, ventos e temperatura entre 18 a 23 °C, podendo manter atividade até a 0 °C. Enquanto para *C. rosea* a temperatura ótima para germinação está na faixa de 24 a 33 °C, e a umidade relativa favorecida é aquela próxima a saturação nestas temperaturas (KÖHL *et al.*, 1999). A verificação destes fatores foi feita nos dias de colheita dos frutos das três culturas em análise, sendo que os dados fornecidos pelo INMET (Instituto Nacional de meteorologia, 2010) estão expressos no Quadro 3.

	Ano	2009								2010
	Mês	Nov	Dez							Jan
	Dia	26	03	07	10	14	17	22	26	02
Temperatura °C	In	23,0	23,0	19,6	25,0	23,4	21,9	27,8	28,5	28,1
	Máx	27,3	24,2	20,4	25,3	24,0	22,0	28,2	30,0	28,9
	Mín	23,5	23,	19,4	23,7	22,5	19,5	26,7	28,0	26,8
UR %	In	81	43	86	61	39	79	58	49	49
	Máx	82	55	90	67	46	87	64	50	53
	Mín	58	41	84	59	35	73	56	39	44
Vento km/h	Velocidade	4,3	2,8	2,2	2,8	2,9	3,6	0,9	3,6	2,2
	Direção	219	194	181	79	313	135	86	250	170
	Rajada	12,1	7,5	6,6	5,0	13,1	7,5	3,5	7,4	5,8
Radiação Wh/m <sup>2</sup> / dia		1.510	4.013	992.0	2.741	3.8446	1.516	1.835	3.075	3.592
		840	956	09	951	85	47	823	.77	556
Precipitação mL/m <sup>2</sup> por dia		0,0	0,0	2,6	5,6	27,0	0,2	0,2	0,0	0,0

Quadro 3 - Dados obtidos pelo INMET na 17ª hora do dia, momento da colheita dos frutos.

As frutas colhidas e colocadas em cumbucas plásticas comerciais deixadas por quatro dias em condições de prateleira a cada data de avaliação, foram então observadas quanto ao número de frutas sintomáticas.

Em amoreiras, a terceira data de avaliação apresentou o maior número de frutos infectados com *B. cinerea* tratados com GFO4, A1, A17, M8, M3, porém tendo controle sob o patógeno estatisticamente diferente da testemunha (Tabela 7). Este dia apresentou a menor temperatura no momento da colheita (19,5) e a menor radiação de todas as datas avaliadas (992.009 Wh/m<sup>2</sup>) o que pode ter favorecido uma maior germinação do patógeno em relação aos candidatos que como *C. rosea* esporula quando estimulado pela luz , segundo Vicine (2004).

Tabela 7 - Número de frutos de amoreira com sintomas de *B. cinerea* em cada data colheita para cada tratamento.

Tratamentos	Avaliações <sup>1</sup>						
	26/11/09	03/12/09	07/12/09	10/12/09	17/12/09	22/12/09	26/12/09
<b>A1</b>	0,66BC	0,00 B	0,33D	0,00 C	0,00 B	0,00 B	0,00 B
<b>GFO4</b>	0,66 BC	0,33AB	1,33 BC	0,33 BC	0,33 B	0,00 B	0,33 B
<b>M3</b>	0,66 BC	0,33AB	1,66AB	1,00AB	0,33 B	0,00 B	0,00 B
<b>M8</b>	1,33 B	0,66AB	1,66AB	0,33 C	0,00 B	0,33 B	0,00 B
<b>Testemunha</b>	3,00 A	1,00 A	2,33 A	1,66 A	2,66 A	1,66 A	1,00 A

<sup>1</sup> Médias de 3 repetições a cada data (dia/mês/ano) de colheita considerada.

Dados que não seguem da mesma letra na coluna diferem entre si pelo teste de DMS de Fisher a 5 % de probabilidade de erro. CV 17,44%

Embora em framboesas o patógeno tenha sido detectado em todas as datas de avaliação (Tabela 8) manifestaram-se em plantas com todos os tratamentos na 1ª, 2ª e 3ª datas de coleta. Na 1ª o isolado GFO4 apresentou controle igual ao da testemunha, enquanto que M8 na 2ª e M3 na 3ª avaliação não diferiram das testemunhas. As condições de umidade nos dias de avaliação, apesar de necessárias ao antagonista, podem ter sido favoráveis a esporulação de *B. cinerea* nesta cultura, resultado que pode ser comparado a similares obtidos por Peng & Sutton (1990).

Tabela 8 - Número de frutos de framboeseiro com sintomas de *B. cinerea* em cada semana de colheita para cada tratamento.

Tratamento	Avaliações <sup>1</sup>						
	10/12/09	14/12/09	17/12/09	22/12/09	26/12/09	29/12/09	02/01/10
<b>A1</b>	0,66 BC	0,33 BC	2,00 AB	0,66C	0,00 D	0,00 C	0,33 B
<b>GFO4</b>	2,33 A	0,33 BC	1,00 CD	0,00 C	0,33 CD	0,00 C	0,33 B
<b>M3</b>	1,33 B	0,33 BC	3,00 A	1,66 B	1,33 B	1,00 B	0,33 B
<b>M8</b>	1,00 BC	1,66 A	1,00 CD	0,66 C	0,00 D	0,00 C	0,33 B
<b>Testemunha</b>	2,33 A	1,33 A	2,33 A	3,66 A	4,66 A	2,00 A	3,00 A

<sup>1</sup> Médias de 3 repetições a cada data (dia/mês/ano) de colheita considerada.

Dados que não seguem da mesma letra na coluna diferem entre si pelo teste de DMS de Fisher a 5 % de probabilidade de erro. CV 17,44%

Porém o número de aplicações dos isolados antes do início da colheita pode ter determinado este resultado em framboeseiro, onde foram realizadas 6 aplicações a partir da floração (três semanas antes da colheita) o que corrobora com Valdebenito- Sanhueza *et. al.* (1997); Melo *et. al.*(1998), quanto ao aumento da eficácia do controle de acordo com o aumento de aplicações dos isolados. Estudos de Yu & Sutton (1997) e Yu & Sutton (1998) sugerem que aplicações com doses de  $10^7$  conídios/mL são mais eficientes em framboeseiro.

Isto pode ser indicativo da necessidade de aplicações com maior concentração ainda antes do início da floração com espaço amíúde entre elas.

Blakeman & Fokema (1982), já preconizavam que o uso de microrganismos isolados do próprio ambiente deve ser preferido, mesmo que outros também sejam eficazes, porém de ambientes distintos. Em mirtilheiro todos os isolados foram eficientes no controle de *B. cinerea* sem diferença entre os isolados obtidos na cultura do mirtilheiro em relação aos demais (Tabela 9), e destes com relação a GFO4.

Apesar da possível variabilidade das espécies nativas de isolados e usadas neste trabalho, as estirpes A1, M8 e M3, colonizaram das plantas de amoreira, framboeseiro e mirtilheiro tratadas, e eficientes em reduzir a esporulação de *B. cinerea* sem produzir nenhum sintoma de doenças.

Tabela 9 - Número de frutos de mirtilheiro com sintomas de *B. cinerea* em cada semana de colheita para cada tratamento.

Tratamentos	Avaliações <sup>1</sup>						
	26/11/09	03/12/09	07/12/09	10/12/09	17/12/09	22/12/09	26/12/09
<b>A1</b>	0,00 B	0,00 B	0,00 B	0,00 NS	0,00 NS	2,00 A	0,33 AB
<b>GFO4</b>	0,66 B	0,00 B	0,00 B	0,00	0,00	0,00 B	0,00 B
<b>M3</b>	0,00 B	0,66 B	0,00 B	0,00	0,00	0,00 B	0,00 B
<b>M8</b>	0,00 B	0,00 B	0,33 AB	0,00	0,00	0,00 B	0,00 B
<b>Testemunha</b>	2,66 A	2,00 A	1,00 A	0,66 A	0,66 A	1,33 A	1,00 A

<sup>1</sup> Médias de 3 repetições a cada data (dia/ mês/ ano) de colheita considerada.

Dados que não seguem da mesma letra na coluna diferem entre si pelo teste de DMS de Fisher a 5 % de probabilidade de erro. CV 17,44%.

#### 4. CONCLUSÕES

Nas condições em que o experimento foi conduzido foi possível observar em:

##### A. Testes conduzidos em laboratório:

-Em testes de cultura pareada realizada em laboratório os isolados A1, A17, M3 e M8 demonstram antagonismo a *B. cinerea*.

-Todos os isolados apresentam mecanismos de competição por substrato, antibiose e parasitismo em hifas de *B.cinerea* em imagens obtidas em microscopia óptica, indicando um bom potencial de biocontrole.

- Os isolados A1, M3 e M8 não desenvolvem sintomas nas plantas em testes de fitopatogenicidade.

##### B. Testes de casa de vegetação:

- Os isolados A1, M3 e M8 são capazes de colonizar todas as culturas em estudo.

- Os isolados A1, M3 e M8 apresentam controle superior nas culturas de amoreira, framboeseiro e mirtilheiro quando comparados ao isolado GFO4 obtido de morangueiros.

- Para as folhas de mirtilheiro, M3 e M8 isolados de mirtilheiro apresentaram os melhores níveis de colonização em relação aos isolados de amoreiras.

##### C. Testes conduzidos a campo

- Todos os isolados candidatos aplicados a campo realizaram biocontrole sobre *B. cinerea*.

- As condições de umidade nos dias de avaliação, podem ter favorecido a esporulação de *B. cinerea*, mas o controle exercido pelos isolados foram superiores em relação a testemunha.

- O controle exercido pelos isolados candidatos não indicaram especificidade antagonico-planta.

-Nenhuma planta apresentou sintomas de doenças causadas pelos isolados A1, M3 e M8.

-Os isolados candidatos podem ser antagonicos ou patógenos de ciclo *saprofítico* ou *Formae speciallis*, tendo controlado o *B. cinera* sem atacar a planta.

## 8. CAPÍTULO IV

### CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS ISOLADOS DA REGIÃO RIZOSFÉRICA DE AMOREIRA, FRAMBOESEIRO E MIRTILEIRO ANTAGONISTAS A *Botrytis cinerea*

#### RESUMO

Fungos isolados de solo para uso em biocontrole de patógenos como *Botrytis cinerea* precisam ser caracterizados, sendo a caracterização morfológica a primeira disponível para identificação do agente causal da doença da planta, bem como do antagonico. As características morfológicas mais importantes são a coloração da cultura, as formas dos conídios, e a velocidade de crescimento. No entanto a análise morfológica pode não chegar ao nível de espécie, o que pode ser feito pela caracterização molecular. Neste trabalho, três fungos isolados de solo com culturas estabelecidas de amora, framboesa e mirtilo que apresentaram variações de cor rosa de colônia compatíveis com a descrição literária com *C. rosea* e *Fusarium* sp., foram analisados quanto a morfologia e após submetidos a caracterização molecular realizada através de reação em cadeia da Polimerase (PCR) sendo que para amplificação da região do rDNA foram utilizados os iniciadores ITS1 e ITS4, onde os resultados foram avaliados por eletroforese em gel de agarose. Os produtos da PCR que apresentaram aproximadamente 600 pares de base (pb) sequenciados possibilitaram a construção da árvore filogenética dos biótipos dos isolados. Após realizado o sequenciamento foi possível fazer o alinhamento das sequências obtidas no software Clustal W e comparar com as sequências do genbank.

**Palavras- chave:** fungo. morfologia, caracterização molecular.



**CHARACTERIZATION OF FUNGI ISOLATED FROM SOIL OF MULBERRY,  
RASPBERRY AND MIRTILEIRO ANTAGONISTS OF *Botrytis cinerea***

**ABSTRACT**

Fungi isolated from soil for use in biocontrol of pathogens such as *Botrytis cinerea* must be characterized, and the morphological aspects are the first available to identify the causal agent of plant disease, as well as antagonistic. The most important morphological features the color of the culture, forms of conidia, and growth rate. However morphological analysis may not reach the level of species which can be done by molecular characterization. In this work, three fungi isolated from soil with established cultures of blackberry, raspberry and blueberry showed that variations of pink colony compatible to the literature with *C. rosea* and *Fusarium* sp, were analyzed for morphology and after undergoing molecular characterization performed using polymerase chain reaction (PCR) and for amplification of the rDNA region of the primers used were ITS1 and ITS4, where the results were analyzed by electrophoresis agarose gel. PCR products that were approximately 600 base pairs (bp) sequences allowed the construction of the phylogenetic tree of isolates of biotypes. After performing the sequencing was possible to align the sequences obtained in Clustal W software and compared with the sequences of GenBank.

**Keywords:** fungi. morphology. molecular characterization

## 1. INTRODUÇÃO

O controle biológico vem utilizando microrganismos nos processos de produção e proteção agrícola em sistema de produção orgânica e integrada sendo uma alternativa saudável pela diminuição de resíduos no solo e nos alimentos. Diversas pesquisas têm sido desenvolvidas, no sentido de substituir e/ou diminuir a utilização de insumos químicos residuais. O isolamento de microrganismos é o primeiro passo para a sua utilização em biocontrole com eficácia a ser comprovada através de testes *in vitro* e *in vivo* e posterior disponibilização comercial na agricultura. Antes desta disponibilização precisam estar devidamente caracterizados, classificados e ordenados.

A taxonomia considerada como sinônimo de sistemática é utilizada para classificação e ordenação de organismos (STUESSY, 1990; HAWKSWORTH *et al.*, 1995).

O Index Fungorum revisado e atualizado periodicamente, organizado por diferentes e renomadas instituições (CAB Biosciences, Inglaterra; CBS, Holanda, e Landcare Research, Nova Zelândia) é fonte de referência confiável para pesquisas. De acordo com o banco de dados virtual GenBank (NCBI) que utiliza o Index Fungorum como fonte de referência os fungos do gênero *Clonostachys* e *Fusarium* pertencem a Filo *Ascomycota*.

Além de apresentarem fases anamórfica e telemórficas, uma forte característica apresentada pelos Ascomycotas, é a presença de micélio septado, com paredes celulares contendo quitina e glucanas, e a produção de um tipo especial de frutificação denominado asco. Embora os ascomycotas possam se diferenciar macroscopicamente de fungos pertencentes a outras divisões, suas estruturas microscópicas como exemplificado pela presença de ascos, são diagnósticas do grupo (SCHROERS *et al.*, 1999).

### 1.1. O ASCOMYCOTA *Clonostachys rosea*

*Clonostachys* na sua fase telemórfica de *Bionectria* pertence a Subdivisão *Pezizomycotina*, Classe *Sordariomycetes*, Subclasse *Hypocreomycetidae*, ordem *Hypocreales* e família *Bionectriaceae*.

O gênero *Gliocladium* foi descrito por Corda entre 1839/ 1840, a espécie *Gliocladium roseum* de Bainer foi reclassificado na sua forma anamórfica (fase assexuada) como *Clonostachys rosea* (Link: Fr.) por Schroers *et al.* (1999). Foi incluído no gênero *Bionectria* de *Nectria ochroleuca* (teleomórfica), por Schroers e Samuels (1999) ordem Hypocreales, após reinterpretações de caracteres em diferentes estados e considerações das colônias em estado natural e em cultura (SUTTON *et al.*, 1997).

Em meio agarizado este fungo apresenta colônias geralmente esbranquiçadas alaranjadas ou salmão crescendo de forma radial por extensão do extremo de hifas unicelulares, formando micélio verdadeiro não implicando no aumento do tamanho da população. *Clonostachys rosea* apresenta paredes transversais ou septos que permitem a passagem de organelas (morfologicamente discutíveis) de um compartimento a outro (JEED & CHUA, 2000), podendo estar ocluídos por corpos de Woronin, estrutura densa, cristalóide esférico, hexagonal ou retangular com função de manter a integridade hifal (JEED & CHUA, 2000) impedindo o extravasamento citoplasmático seguido de morte (MARKHAN, 1994). Apresentam também, anastomoses, conexões laterais ou pontes que permitem passagem de água, nutrientes e também de organelas (JENNINGS & LYSEK, 1996). As pontas de hifas que não apresentam conidióforos podem ser analisadas pela presença/ausência de vesículas de Spitzenkörper no ápice destas, vistas como uma região mais escura e mais ou menos esférica, que cora com hematoxilina férrica, sendo um complexo dinâmico e polimórfico mudando forma, tamanho e posição durante o crescimento da hifa desaparecendo quando cessa o crescimento que pode ser visto em contraste de luz, no microscópio (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004).

Os conidiomas deste fungo em fase anamórfica, tem fiálides terminais ou sub-terminais sendo as intercalares raras ou ausentes, dimorfismo dos conidióforos e massa colorida, predominantemente hialina, incolor ou esverdeada (SCHOERS, 2001). A produção de esporos é apical sucessiva, produzindo em forma verticiliada, a qual apresenta conidióforos primários que consistem em ramificações que partem de um mesmo eixo e secundários (GANS, 1984 citado por SCHOERS, 2001).

## 1.2. *Fusarium oxysporum*

O gênero *Fusarium* na fase telemórfica, é classificado como pertencente ao reino Eumycota, divisão Ascomycota, classe Euascomycetes, ordem Hipocreales, família Hypocreaceae (DE HOOG *et al.*, 2000 in GODOY & COLOMBO, 2004).

Suas hifas são geralmente septadas com conidioforos variáveis, forma fiálides simples ou em grupos. Os conídios são hialinos e variáveis: macroconídio curvado típico, microconídio ovalado podendo apresentar formação em cadeia e conídio intermediário com 2 ou 3 células curvado ou ovalado. Os três tipos de conídio são produzidos nas culturas e provavelmente no solo, embora no solo possa sobreviver por mais tempo pela formação de clamidósporos, células especiais de descanso onde as hifas se diferenciam tomando forma arredondada, suas paredes se espessam e em seu interior são encontradas substâncias de reserva como glicogênio. Todas as espécies do gênero *Fusarium* formam clamidósporos que se separam das hifas e em condições favoráveis de temperatura e umidade germinam originando novo indivíduo (BALARDIM & COSTA, 2005). Na fase telemórfica, produzem peritécios, envelopes de frutificação que protegem os ascos (SAMUELS, 2001).

Em meio de cultura fungos do gênero *Fusarium* podem apresentar micélio extenso e algodinoso com zonas concêntricas (radial) e colônia de coloração rosa pálido, roxo, alaranjado púrpura ou amarela e até celeste, verde oliva e pardo no verso da mesma (SEIFERT, 2001).

### 1.3. VARIABILIDADE GENÉTICA DOS ISOLADOS POR SEQUENCIAMENTO DO DNA RIBOSSOMAL

Segundo Kuhls *et al.* (1997) estudos clássicos, realizados em fungos somente pela morfologia baseada na similaridade ou ausência de caracteres resulta numa revisão insatisfatória ou limitada pelo baixo número de caracteres fenotípicos a serem analisados (FUNGARO, 2000). Isto porque vários fatores podem afetar as características específicas e variações intrínsecas ao patógeno ou antagônico, ou seja, permite apenas uma identificação em nível de gênero, sujeita a subjetivismo na avaliação.

O conceito de filogenética, que considera as relações genealógicas entre os isolados, tem tido avanços no campo da biologia molecular, pela análise do DNA lançando nova luz sobre as discussões das relações genealógicas evolutivas questionando sobre a maneira como a taxonomia baseada apenas na morfologia era vista até então. A discriminação intra-específica, mais complexa e objetiva, é possível através de avaliações moleculares.

Esta área de pesquisa, especialmente com o uso de métodos moleculares, envolvendo a variabilidade presente ao nível de DNA teve um grande avanço com o desenvolvimento da PCR. Estas novas metodologias têm avançado muito nos últimos anos e provocado uma verdadeira revolução na habilidade de detectar variabilidade a níveis de organismo e

bioquímico. Atualmente, técnicas que utilizam marcadores moleculares estão sendo implementadas para o estudo de diversidade genética em um grande número de grupos de organismos (STRALIOTO & RUMJANEK, 1999).

A maioria dos métodos moleculares se utiliza do produto da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Estas técnicas empregam métodos baseados na amplificação e/ou avaliação de sequência de ácidos nucleicos para estudos da diversidade procariota, possibilitando a análise da comunidade microbiana e o uso dos meios de cultura seletivos e técnicas de plaqueamento (CASAMAYOR *et al.*, 2000). A PCR, usada na descrição de microrganismos (ELSAS *et al.*, 1998) e no estudo da variabilidade de populações de fungos (GUTHRIE *et al.*, 1992; MILLS *et al.*, 1992) foi descrita por Saiki *et al.* (1985), como uma técnica muito sensível de análise que consiste na amplificação de pequenos e específicos segmentos de genoma, e permite obter *in vitro*, várias cópias de determinadas regiões do DNA.

Para os PCRs deve-se em primeiro lugar extrair o material genético da célula. Normalmente o material extraído é o DNA que depois de extraído sofre a adição de uma mistura (pré-mix) que contém os dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatos), que são as bases nitrogenadas ligadas com três fosfatos, os *primers* também chamados de oligonucleotídeos e a enzima DNA polimerase em uma solução tampão.

Para a análise de diversidade genética e filogenia é apropriado o uso de genes do rDNA (Ácidos desoxiribonucleicos ribossomais), distribuídos de forma ampla entre os seres vivos (JUNIOR *et al.*, 2002), sendo normalmente encontrados em múltiplas cópias, com regiões gênicas (18S, 5,8S e 28S) altamente conservadas e unidas por regiões espaçadoras (ITS1 e ITS2) que podem ser altamente variáveis e curtas (500 a 800 pb), surgindo em grande número de cópias no genoma carregando informações sobre a filogenia e o nível taxonômico (FREEMAN *et al.*, 2001).

O rDNA proporciona meios para a análise filogenética, de acordo com os níveis taxonômicos das espécies, permitindo assim a separação dos isolados em espécies distintas e, conseqüentemente, diferenciação dos isolados dentro de cada espécie (FUNGARO, 2000).

A eletroforese em gel de agarose é uma técnica de separação de moléculas que envolve a migração de partículas no gel durante a aplicação de uma diferença de potencial, separando moléculas de acordo com seu tamanho, onde as de menor massa migram mais rapidamente ou de formato que obtenham mais facilidade de migração. Após a eletroforese em gel, os fragmentos de DNA normalmente são corados por brometo de etídeo e fluorescem

vivamente com a luz ultravioleta, permitindo localizar as bandas correspondentes ao DNA que devem ser analisadas.

Posteriormente o uso de programas computacionais permite a comparação destas seqüências auxiliando nos estudos filogenéticos que podem ser comparados em bancos de dados de estudos de nucleotídeos (MARTINS, 2005).

O objetivo deste trabalho foi de proceder a uma análise da biodiversidade com caracterização e conseqüente verificação da relação filogenética entre os isolados fúngicos com cor de colônia rosada, obtidos de culturas estabelecidas de amora, framboesa e mirtilo, na busca de antagonicos para o controle de *B. cinerea* causador da podridão cinzenta em diversas culturas. Considerando as afirmações de Fungaro (2000) no que diz respeito à limitação de análises morfológicas, os fungos assim avaliados foram submetidos a uma análise molecular que possibilita conhecer as relações filogenéticas existentes entre eles.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios de Microbiologia da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Lages, SC; da Universidade de Caxias do Sul, Campus de Vacaria (UCS), RS e de Genética do hospital das Clínicas de Porto Alegre, RS.

### 2.1. OBTENÇÃO DOS ISOLADOS

Foram utilizados três isolados que apresentaram antagonismo a *B. cinerea* em experimentos conduzidos anteriormente em amoreiras, framboeseiros e mirtilheiros à campo. Os isolados foram: A1 oriundo de isolado de solo na região rizosférica de amoreiras, M3 e M8 da região rizosférica de mirtilheiros, e GFO4 pertencente a coleção da Embrapa Uva e Vinho oriundo de morangueiros.

A multiplicação dos isolados foi através de repiques cortados discos de 3mm de diâmetro da colônia estoque e colocados em placas de Petri contendo meio BDA estéril com adição de 5ppm de estreptomicina, tornando o meio seletivo para fungos. As placas foram vedadas com film plástico e levadas a incubação em estufa tipo BOD a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas, por sete dias. Após este período foram mantidas sob refrigeração de 4 °C.

### 2.2. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS

A estrutura dos isolados foi comparada com a literatura disponível quanto às características morfológicas de cor de colônia; incremento da massa fúngica; hifas (presença de septos, Woronin, anastomoses, vesículas de Spitzenkörper; dimorfismo) forma de conidióforos e tipo de conídios.

A primeira avaliação foi feita pela observação da coloração e crescimento hifal de colônias purificadas, desenvolvidas em meio BDA por 7 dias em estufa tipo BOD, com 21 °C e fotoperíodo de 12 horas. O incremento de massa fúngica foi avaliado pelo crescimento

médio das colônias de cada isolado e este foi comparado com o obtido em mesmas condições com o isolado GFO4.

Amostras das estruturas reprodutivas, foram analisadas no microscópio óptico com aumento de 400 vezes. O microscópio acoplado a tela de TV, permitiu um aumento de uma parte da amostra para 32 polegadas que permitiu além de melhor visualização, fotografar estruturas dos fungos em estudo para comparação com a literatura.

As pontas de hifas das subamostras que não apresentam conidióforos foram analisadas pela presença/ausência de vesículas de Spitzenkörper no ápice destas, vistas como uma região mais escura e mais ou menos esférica. Para isto foram retiradas pontas de hifas das colônias dos isolados com agulha histológica flambada em álcool 95 °C, colocadas em lâmina, coradas com uma gota de hematoxilina férrica cobertas com lamínulas e levadas para observação em microscópio de luz. A avaliação foi feita segundo Esposito & Azevedo (2004) que conferem Padrão 1: o conjunto de vesículas é escura sem área central (core) característico dos basidiomicotas; padrão 3: conjunto de vesículas com core claro, orientado em direção ao ápice, característico dos ascomicetos; padrão 6: forma de taças, polarizado, rodeado de um core grande e claro onde também estão incluídos os basidiomicotas e padrão 9: ausência de core.

## 2.3. ANÁLISE MOLECULAR DOS ISOLADOS

### 2.3.1. Extração de DNA

A extração de DNA foi feita a partir das colônias dos isolados fúngicos e de *C. rosea* (GFO4) que estavam sendo mantidos sob refrigeração a 4°C.

As colônias refrigeradas foram raspadas e aplicadas em cartões FTA® (Classic Card), projetados para coleta de material em ar seco e temperatura ambiente para purificação de ácidos nucleicos. O material transferido para os cartões foram amassados com um pistilo de porcelana por 15 segundos visando estourar as paredes celulares (Ao aplicar pressão é importante ter uma batida rápida e forte suficiente para quebrar as paredes celulares num ângulo de 90°. Ao mesmo tempo, bater o cartão muito fortemente irá destruir a matriz). Após este procedimento, as FTA® foram deixadas em temperatura ambiente para secar por 1 hora ou mais e obter completa secagem do cartão antes de perfuração para garantir a integridade da amostra impressa. Após este tempo os cartões contendo as amostras foram colocados sobre uma esteira plastica de 30cm x 15cm e usando um microperfurador (Harris Micro Punch Tool



®) de 2,0 mm, foram removidos discos a partir do centro da área de amostra seca. Cada disco foi transferido para um tubo apropriado para amplificação (tubo de 1,5mL para microcentrífuga) e a cada tubo foi adicionado 200µL de solução tampão de lise (Tris-HCl 50mM pH 7,2; EDTA 50mM pH 8,0; SDS 3%; β-Mercaptoetanol 1%) sendo o tubo invertido duas vezes e deixado em repouso por 5 min em temperatura ambiente. Os demais reagentes foram pipetados e procedeu-se a mesma inversão e repouso. Utilizando uma pipeta foi removido e eliminado o máximo possível dos reagentes. Foi repetida a pipetagem e remoção dos reagentes.

Em seguida foi adicionado a cada tubo 200 µL de TEQ1 (10 mM Tris, 0,1mM EDTA) que após tampado foi virado duas vezes e incubado durante 5 minutos em temperatura ambiente, após o que, os reagentes foram pipetados para retirar o máximo possível RTE. O procedimento de adição e pipetagem de TEQ1 foi repetido.

Cada disco FTA® foi então transferido para um tubo de PCR com uma pinça limpa e esterelizada. Os discos secaram por uma hora em temperatura ambiente.

Ao manusear os discos secos foram tomados cuidados por causa da carga estática que pode se desenvolver em alguns materiais de plástico de laboratório que podem repelir os discos. Desde que o processo de purificação do DNA remove a proteção química da FTA®, recomendou-se que a amplificação do PCR fosse realizado dentro de um período de três horas de secagem ou a amostra armazenada a 4° C.

### 2.3.2. Amplificação das amostras do DNA

As regiões ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA foram amplificadas utilizando os iniciadores ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3' e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (*Invitrogen*) (WHITE *et al.*, 1990). Seguindo a metodologia modificada de Saiki (1988), cada tubo de PCR contendo amostra com DNA purificado seco, sofreu o acréscimo de 25-50µL do mix completo de amplificação e levado a Termociclador Biocycler MJ96+®, programado com ciclos de temperatura pré-estabelecidos e tempos exatos específicos para cada reação (fragmento a ser amplificado). Na primeira etapa do ciclo a temperatura foi elevada de 94 °C por 4 minutos para separar a dupla cadeia de DNA (Desnaturação). Na segunda etapa, a temperatura foi reduzida a 55 °C, para que os primers se anelassem (processo de pareamento) com a fita molde de DNA (anelamento). Na última etapa do ciclo a temperatura foi elevada a 72°C por 90 segundos e por fim uma extensão final a 72°C por 10 minutos para a enzima

funcionar sintetizando a nova molécula. Em seguida um novo ciclo foi iniciado até completar 30 ciclos.

Para a amplificação das amostras foram utilizados um total de 50  $\mu\text{L}$  de componetes, sendo a mistura realizada através de pipetagem de 28,25  $\mu\text{L}$  de água ultra pura, 5,0  $\mu\text{L}$  de solução tampão, 0,5  $\mu\text{L}$  de dNTPs, 5,0  $\mu\text{L}$  de iniciador ITS1, 5,0  $\mu\text{L}$  de iniciador ITS4, 3,0  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$ , 0,25  $\mu\text{L}$  de Taq polimerase e 3,0  $\mu\text{L}$  de DNA.

### 2.3.3. Eletroforese em Gel de Agarose

Após a amplificação, 4  $\mu\text{L}$  da reação de PCR, mais 4  $\mu\text{L}$  de tampão decorrida, foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 2%: 7g de agarose aquecidos no microondas por 2-3 minutos em potência máxima até a completa dissolução da agarose. Após o resfriamento desta solução foi adicionado ( $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) 6,5  $\mu\text{L}$  de Brometo de Etídio. O volume do gel foi completado para 80 mL, colocado no injetor de gel, e, em tampão TBE 1X (Tris – HCl 0,89M; Ácido Bórico 0,89M; EDTA 0,02M), juntamente com um padrão de peso molecular de 100 pb (pares de base).

Sequencialmente, o gel foi vertido continuamente na placa aderente sobre a qual ficaram os espaçadores cobertos pela placa repelente, com grampos nas laterais da placa nivelada. Após verter o gel, foi colocado o pente invertido na placa fixado com os grampos e deixado em repouso para completa polimerização.

Para correr o gel foram seguidos os seguintes passos: Antes de colocar o gel para aquecer, foram limpos os resíduos nas placas e no local onde fica o pente; a seguir foram retirados os grampos da placa e o gel encaixado no suporte (cuba de eletroforese Gator™®); o espaço onde fica o pente foi limpo, não tocando na linha deste pente. Após, o tampão foi colocado em cima e embaixo das placas; encaixados os suportes das correntes; conectados os plugs na fonte; colocado o medidor de temperatura e só então o gel foi aquecido por 45 minutos (a temperatura chegando a  $45^\circ\text{C}$ ) com tampão TBE 1X.

As canaletas foram limpas com borrifador e com o gel já aquecido o pente foi colocado criando poços para a colocação das amostras que foram aplicadas rapidamente, deixando correr por 15 minutos, desligando e tirando o pente. Após este procedimento as amostras ficaram correndo no gel por um período aproximado de 1 ½ horas (aquecimento: 1300V 46mA 60W e após aplicar as amostras: 900V 75mA 75W). Como o DNA é carregado negativamente foi sendo atraído pelo eletrodo positivo migrando através do gel de agarose. Após a corrida das amostras na presença da corrente elétrica, o gel foi visualizado em luz

ultravioleta que fez o DNA brilhar (como “rastros” deixados no processo da corrida) pela adição do brometo de etídio, fotografado.

#### 2.3.4. Sequenciamento da região ITS do rDNA

O sequenciamento foi realizado no Laboratório de Identificação Genética (LIG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre-RS. Os produtos da reação de PCR foram encaminhados para o LIG para a realização do sequenciamento, o qual foi realizado no ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems). Juntamente com o produto da reação de PCR foi encaminhada a solução dos primers ITS1 (10 $\mu$ M) e ITS4 (10 $\mu$ M), utilizada na reação de PCR.

#### 2.3.5. Análise filogenética

As sequências obtidas através do sequenciamento foram utilizadas para fazer o alinhamento pelo software Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) e após foram processadas no Software Mega 3.1, para construção da árvore filogenética dos isolados. Foi utilizado o método de TAMURA-NEI (1993) para a construção da matriz de distâncias, e o método de *Neighbor-Joining* (NEI, 1987) para a construção da árvore.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. ANÁLISE MORFOLÓGICA

Na análise feita através da observação e comparação da cor das colônias, os isolados apresentaram coloração entre o rosa claro e alaranjado (Anexo 1), compatível com *C. rosea* GFO4, isolado de morangos e comparável com coloração descrita na literatura por Seifert (2001) em *Fusarium* sp.

A avaliação do incremento de hifas dos isolados avaliados pela média da medida do raio de 5 colônias crescidas em placas de Petri demonstrou um maior crescimento do isolado A1, ficando M8 e M3 com média próxima a obtida por GFO4 *C. rosea* (Tabela 10).

Tabela 10 - Média do crescimento do diâmetro das colônias dos isolados candidatos, comparadas a obtida pelo isolado GFO4 de *C. rosea*.

Isolado	Média da medida do Raio (cm)
<b>GFO4</b>	6,0*
<b>A1</b>	9,0
<b>M8</b>	5,8
<b>M3</b>	6,2

\*Médias obtidas em 5 placas de cada isolado

As observações das estruturas fúngicas feita através de métodos de microscopia óptica permitiu observar que à medida que as hifas foram crescendo e se ramificando iniciaram o processo de diferenciação hifal, o que caracteriza um crescimento polarizado, corroborando com Esposito & Azevedo (2004) de que esta é uma característica comum a fungos filamentosos com micélio verdadeiro, como é o caso de *C. rosea* e *Fusarium* sp.

Não foi possível observar corpo de Worin ocluindo parcialmente poros de septos do isolado A1, o que por si só, não exclui a possibilidade de ser *C. rosea*, porém foi o único que apresentou peritécios o que segundo Samuels *et al.* (2001) é uma característica da fase

telemórfica encontrada nos gêneros *Cosmospora*, *Nectria* e *Gibberella*, fase telemórfica de *Fusarium* sp., podendo sugerir que A1 seja este fungo.

A presença de pontes de ligação entre hifas vizinhas ou anastomoses que conforme literatura são encontradas em fungos como *C. rosea* puderam ser visualizadas nos três isolados em estudo bem como no isolado GFO4. No ápice de algumas hifas foi possível observar a presença de vesículas de Spitzenkörper em contraste de luz, vistas como uma região mais escura e mais ou menos esférica apresentando conjunto de vesículas com core claro, orientado em direção ao ápice compatível com o padrão 3, o que para Esposito & Azevedo (2004) é característico dos ascomicetos que são septados (Anexo 2).

Em primeira observação, os conídios se apresentaram sob forma de microconídios, unicelulares ovais em fialosporos hialinos ou coloridos em massa com produção apical sucessiva, o que poderia ser uma característica de *C. rosea*. Porém, em diversas observações posteriores foram verificados conídios médios (mesoconídio) formados por 2 células, o que segundo Seifert (2001) é encontrado em poucas espécies de *Fusarium*, e ainda macroconídios levemente curvos e septados característicos do gênero. Isto corrobora com Boot (1971), quando afirma que este fungo nem sempre produz todos os tipos de esporos, o que pode dificultar uma caracterização baseada apenas em uma primeira análise morfológica. Porém os conidióforos destes fungos apresentam diferenças.

### 3.2. ANÁLISE FILOGENÉTICA

A quantificação do DNA genômico extraído dos fungos A1, M3 e M8 isolados de culturas de amoreira, framboeseiro e mirtilheiro e de GFO4 obtido de estruturas de morangueiros mostrou aproximadamente 600pb (pares de base). Esta PCR resultou da utilização dos iniciadores ITS1 e ITS4 em gel de agarose 2% (Figura 8). Após realizado o sequenciamento foi possível fazer o alinhamento das sequências obtidas no software ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) no qual se observou a diferença genética existente entre os biótipos. Foi utilizado junto ao alinhamento das sequências um *outgroup* de *Cucumis* sp. para enraizar a árvore filogenética. (Anexo 4).

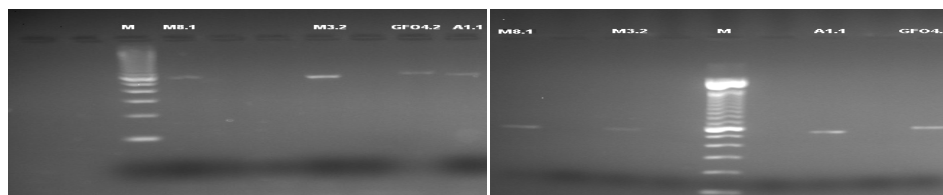


Figura 8 - Gel da extração e quantificação do DNA genômico extraído de isolados A1 de solo de amoreira, M3 e M8 de solo de framboeseiro e GFO4 de tecidos de morangueiro com o marcador Lambda.

As sequências de DNAs obtidas dos isolados A1, M3 e M8 e GFO4 mostram que existe diferença genética entre os biótipos dos fungos isolados, sendo que A1, M3 e M8 pertencem ao um mesmo grupo, porém diferem geneticamente entre si, embora M3 e M8 estejam muito próximos. Estas diferenças podem ser evidenciadas pela construção da árvore filogenética através do software Mega 3.1 a partir das seqüências obtidas e alinhadas utilizando-se o software Clustal W (Figura 9).

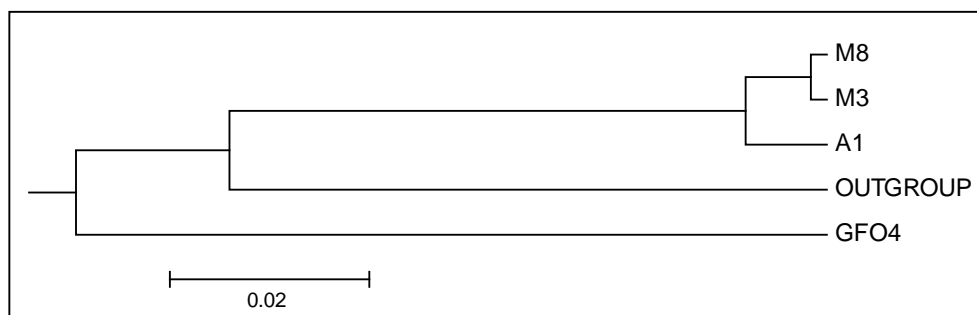


Figura 9 - Árvore filogenética construída pelo software Mega 3.1 a partir de seqüências da região ITS1-5,8S e ITS2 do rDNA de biótipos de isolados fúngicos utilizando o método *Neighbor-Joining* e utilizando como *outgroup* a seqüência do biótipo de *Cucumis* sp. obtida no *GenBank*.

Através da pesquisa no *Blastn* encontrou-se organismos cujas seqüências se assemelham com as seqüências confrontadas. A similariedade das bases entre as seqüências obtidas neste estudo quando confrontadas com as do *GenBank* foram de 99% a 100% que segundo ALTSCHUL *et al.* (1997) indica alta confiabilidade de correlação entre o isolado confrontado com aquele semelhante depositado no banco de dados. Isto nos permite afirmar com maior precisão a identidade dos isolados utilizados neste trabalho demonstrados através de relações filogenéticas (Quadro 4).

Isolado	Blast	Espécie	Score	Evalue	Índice de similaridade
A1	HQ637284.1	<i>Giberella moniliformes</i>	893	0,0	99%
M8	JN222394.1	<i>Fusarium oxysporum</i>	593	0,0	99%
M3	HQ451894.1	<i>Fusarium oxysporum</i>	898	0,0	100%
GFO4	HM849054.1	<i>Bionectria</i> sp.	931	0,0	99%

Quadro 4 - Análise de confrontação das sequências obtidas com as do banco de dados do *GenBank*, por meio do *Blastn* com a espécie de maior score.

Segundo Fungaro (2000), através do rDNA, é possível a separação dos isolados em espécies distintas e conseqüentemente a diferenciação dos isolados dentro de cada espécie. Os isolados M3 e M8 são espécies de *Fusarium oxysporum* porém diferem entre si dentro da filogenia. A1 representa o gênero *Giberella monillia* que corresponde a fase telemórfica de *Fusarium oxysporum*, segundo o INDEX Fungorum acessado em outubro de 2011, completando e confirmando o que foi observado em análise morfológica.

Os isolados M3, M8 e A1, apesar de pertencerem ao mesmo gênero, são de espécies diferentes e não desenvolveram doenças quando testados em trabalhos anteriores quanto a sua patogenicidade em culturas de amoras, framboesas e mirtilos, podendo, segundo Hamada (2005) estar em fase de ciclo saprofítico ou *formae specialis* não desenvolvendo doença quando aplicados nestas culturas.

#### 4. CONCLUSÕES

- A análise morfológica das colônias dos isolados A1, M3 e M8 possibilitou a determinar o Filo dos mesmos como sendo *Ascomycetos*.

- A fases anamórfica e telemórfica sómente foram determinadas através de identificação molecular.

- As sequência de bases da região ITS1-5,8S-ITS2 permitiram inferir sobre a possível espécie de fungo que pertence o segmento de DNA analisado, constituindo uma ferramenta útil em estudos de diversidade genética;

- As sequência de bases do isolado A1 corresponde a *Giberella moliformes*, telemorfo de *Fusarium* sp.

- As sequências obtidas em GFO4 correspondem a *Bionectria* sp, fase telemórfica de *Clonostachys rosea*.

- Os fungos M3 e M8 apresentam sequências de bases correspondentes a espécies de *Fusarium oxysporum*, diferentes quanto a filogenia.

- A ausência de sintomas em plantas inoculadas anteriormente podem indicar que as espécies M3 e M8 estão em fase de ciclo saprofítico ou não *Formae speciallis* não desenvolvendo doença quando aplicados.

-O isolado GFO4 quando em análise molecular, demonstrou ser *Bionectria* sp., o que corresponde a fase telemórfica de *C. rosea*.



## 9. CONCLUSÕES GERAIS

- O controle biológico de *Botrytis cinerea* em pequenos frutos pode ser potencializado pelo uso de fungos antagonistas em co-inoculação.
- A característica de antagonismo a *B. cinerea* pode ser expressada por outros fungos que não aqueles já conhecidos como *Clonostachys rosea* e *Trichoderma* sp., o que justifica a continuidade dos trabalhos nesta linha de pesquisa.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRFICAS

AGRIOS, G. N. (1997). **Plant Pathology**, Academic Press,[S.I], 4ª Ed., pp. 635.

ALMEIDA, J.A. II Fatores Abióticos. In; Boldrini, I.I. (coord.) **Relatório final do Subprojeto Biodiversidade dos Campos do Planalto das Araucárias**. (MMA/ MCT/ PROBIO 02/2001) Porto Alegre,RS.[s.n.], 2006.p 11-30.

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, v.25. p.3389-3402, 1997.

ANDREWS, J.H.; Biological control in the phyllosphere. **Annual review of Phytopatology**, St Paul, [s.n.] v.30, n.1, p. 603-635, 1992.

ATLAS, R.M.; BARTHA, R. 2002. Ecologia microbiana y microbiologia ambiental. Cuarta edición. Pear son Education S.A. madrid. España. pp696

ANTUNES, L.E.C.; REGINA, M.A.; DUARTE FILHO, J. A cultura da amora preta. **Boletim Técnico EPAMIG**, Minas Gerais.[s.n.], 69: 11-15. 2002.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L.;MACCHERO.NI JR., W. (2003).Importância dos microrganismos endofíticos na agricultura. **RAPP**. [S.I. s.n.] 11:333-371. ,[S.I. s.n.] 46(5):pp342-345.

BALARDIN, R.; COSTA, I. D. 2005. Polígrafo de Fitopatologia- Departamento de Defesa Fitossanitária.Abrlil, 2005.

BALMER, E. Classificação de Doenças. In GALLI, F. org. Manual de Fitopatologia.1978.1ª Ed. Cap 14 pp 258-293.SP. Ed Céres LTDA.

BANGEL, E.V. **Caracterização de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. recomendadas para a cultura da soja no Mercosul**. 2000. 114p. (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BAKER, R.F. & COOK, R.J. Biological control of plant Pathogens. San Francisco: W. H. Freeman, 1974. 433p.

BARNET, H.L.; HUNTER, B.B.. **Effects of *Trichoderma* spp. And *Gliocladium roseum* culture filtrates on seed**

**germination of vegetables and maize**. Illustrated Genera of Imperfect Fungi.[S.I.], 3ª ed. Ed Burgess Publishing Company.1972.

BARNETT, H.L. & HUNTER, B.B. Illustrated genera of imperfect fungi. Third edition. Minnesota. Burgess Publishing Company. 1998. [ [Links](#) ]

BELL, D.K.; WELL, H. D.MARKAM, C.R. (1982). In vitro Antagonism of *Trichoderma* species Against Six Fungal Plant pathogens. **Ecology and Epidemiology**. [S.I. s.n.],72 (4): pp 379-386

BÉLANGER, R.R., N. DUFOUR, J. CARON, AND N. BENHAMOU. 1995. Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism.[S.I.], **Bio. Sciech**. **5**: 41

BETTIOL, W. (1991a).Controle Biológico de Doenças do Filoplano. Controle biológico de doenças de plantas. EMBRAPA-CNPDA, Jaguariúna/SP, doc. 15:33-51; 224-233.

BETTIOL, W (1991). Seleção DE microrganismos Antagônicos a Fitopatògenos. In Bettiol, W. Controle Biológico de Doenças em Plantas.1991. Cap. 15 pp 223- 236 .Jaguariúna. SP.

BETTIOL, W. ; MORANDI, M. A. B.( 2009).**Biocontrole de Doenças em Plantas: Uso e Perspectivas**. EMBRAPA-CNPDA, Embrapa meio Ambiente, SP.pp 8-14.

BERRIE, A. Botrytis, Powdery Mildew and Blackspot of Strawberry. **Proceedings of National Soft Fruit Conference**.

TEAGASC – The Irish Agriculture and Food Development Authority Horticultural Research International, East Mallang [s.n], UK,March, 28th, 2000

BERSTEIN, B.; ZEHR, E. I.; DEAN, R.A. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan, and others hosts. Plant Disease [S.I. s.n.]79:478-482, 1995.

BETTIOL, W. ; MORANDI, M. A. B.( 2009).Biocontrole de Doenças em Plantas: Uso e Perspectivas. Embrapa meio Ambiente, Jaguariúna, SP.pp 8-14.

BHATT, D.D.; VAUGAN, E.K. (1962). Preliminary investigations on biological control of gray mold (*Botrytis cinerea*) of strawberries. **Plant Diseases Reporter**

BOFF, P. KASTELEIN, J. DE KRAKER, M. GERLAGH AND J. KÖHL (2001) Epidemiology of grey mould in annual waiting-bed production of strawberry, *European Journal of Plant Pathology* **107** (2001), pp. 615–624. [Full Text via CrossRef](#) | [View Record in Scopus](#) | [Cited By in Scopus](#) (4)

BOFF, P.; KRAKER, J.; GERLAGH, M.; KÖHL, J. The role of petals in developmentof grey mould in strawberries. **Fitopatologia Brasileira**,[S.I. ] v.28(1), p.76-83, jan. 2003

BOOTH C. 1971. The Genus *Fusarium*. CMI. Kew, Surrey. pp. 19-31.

BLAC.P. 1998. Les pigments rouges de Monascus. Biofutur., 183: 34-36.

BLAKEMAN, J.P.; FOKEMA, N.J. (1982). Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. **Annual Reviews Phytopathology**, [S.I. s.n.] 20:167-197

BRAUN, P.C.; SUTTON, J.C. (1987). Inoculum sources of *Botrytis cinerea* in fruit rot of strawberries Ontário-Canadian. **Journal of Plant Pathology**, **9**: 1-5

CAFÉ FILHO, A. C. & LOBO JR., M. (2000). Manejo de fatores físicos e culturais para controle de patógenos do solo. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 8: 267-301

CAPIEAU, K.; STENLID, J; STENTÖM, E.. Potential for biological control of *Botrytis cinerea* in pinus *Sylvestris* seedlings.. **Scandial Journal of Forest research**. V.19. p. 312-319. 2004.

CAFÉ FILHO, A. C. & LOBO JR., M. (2000). Manejo de fatores físicos e culturais para controle de patógenos do solo. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 8: 267-301

CASAMAYOR, E.O.; SCHFER, R. H.; BANEKAS, L.; PEDRÓSALIÓ,C.;MUYZER, G. 2000. Identification and Spatio temporal.Differences between Microbial Assemblages from Two Neighboring Sulfurous Lakes. Comparison by microscopy and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, 66: 499-508.

CASSIOLATO, A. M. R.; SOUZA, N. L. (2000). Controle biológico de *Rizoctonia solani* por isolados de *Rhizoctonia* ssp. Não patogênicos ou hipovirulentos. In. *Controle Biológico*. Melo,I. S.; Azevedo, J. L., v 3, pp. 117-140Z

CAPRA, F. (1982), **O ponto de mutação: A ciência, a sociedade e a Cultura emergente**. São Paulo: Cultrix, 447p.

CELAR, F.; VALIC, N. University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Agronomy Department, Institute of Phytomedicine, Standart Methods- Método 9215 B/2005 21ª edição/ WEF, AWWA, APHA- INMETRO- escopo da acreditação- ABNT NBR, ISSO/ IEC 17025- Ensaio. 2005

CHET, I. Trichoderma: application, mode of action, and potential as a soilborne plant pathology fungi. In:CHET, I. **Innovative approaches to plant diseases control** (Series in ecological and Applied microbiology,. N.York,: WILEY & SONS: 1987, p. 137-160.

COOK, R. J. & BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St Paul: The American Phytopathological Society, 1983. 539p.

COLEY, S.Jr.; VERNOEFF, K.; JARVIS, W. R. (1980). **The *Gliocladium roseum* the biology of *Botrytis cinerea***. London Academic Press Inc. Ltda, , 11: 230- 232

COUTINHO,E.F.; GOMES, F.R.C. **Frutas de Clima Temperado e Subtropical: Algumas propriedades medicinais**. Informativo do projeto: Quintais orgânicos de Frutas: contribuição para a segurança alimentar em áreas rurais, indígenas e urbanas.[S.I]. Embrapa Agropecuária de Clima temperado (2005).

CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)

CRUZ, C. D. **Programa Genes – versão Windows**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa : UFV, 2001. 648p

DALL'ONDER, G. M; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; INGLIS, C. (2001). Seleção de isolados de *Gliocladium* antagonistas a *Botrytis cinerea* em morangueiro no Rio Grande do Sul. VII Reunião de Controle Biológico de Fitopatógenos. **Anais**. Bento Gonçalves/RS, EMBRAPA -CNPV, p.88.

DELÉAGE, J. P. (1993), **História de la ecologia; uma ciência del ombre y la natureza**. Barcelona: ICARIA, 364p.

DENIS, C.;WEBSTER,J. Antagonistic proprieties of species-groups of *Trichoderma*,. 1971.

1971.a. Production on non volatiles antibiotics. **Transactions of the British Mycolycal Society**, Cambridge, ,[ s.n.] v. 57, p. 25-39.

DESTÉFANO, R. H. R. Detecção e identificação de *Metarhizium anisopliai* em larvas de *Diatraea saccharales* por primer específicos. 2003. 72 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiros”, Universidade de São Paulo, São Paulo,2003

DIANEZ F.; SANTOS M.; BLANCO R.; TELLO J.C. Fungicide resistance in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry crops in Huelva (southwestern Spain), *Phytoparasitica* **30** (2002), pp. 529–534. [View Record in Scopus](#) | Cited By in Scopus (12)

DUBOS, B.; BULIT, J. (1979). Filamentous fungi as biocontrol agents on aerial plant

surfaces phyloplane. London, Academic Press Inc. Ltda. **7**:353-367

DURÁN, N.; TEIXEIRA,M.F.S.; ESPOSITO, E. Pigmentos fúngicos e seu potencial biotecnológico. 2004. In Orgs ESPOSITO, E. & AZEVEDO, J. L.. **FUNGOS: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EducS, 2004. 510: 290-307.

EGGERT, K., HOLMANN, J., HILLER, B., KRUSE, H.P., RAWEL, H.M., PAWELZIC, E. (2010) Effects of Fusarium Infection on the Phenolics in Emmer and Naked Barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010 Feb 9. [Epub ahead of print]

EDEL, V.; STEINBERG, C; GAUTHERO, N; ALABOUVETE, C. Populations of nonpathogenic fusarium oxysporum associated with roots of four plant species compared to Soilborne populations. *Phytopathology*. V 84.

ELAD Y AND STEWART A., 2004. Microbial control of *Botrytis* spp ,[S.I. s.n.]

ELLIS, M. A. A.; CONVERSE, R. H.; WILLIAMS, R. N.; WILLIANSON, B. (1997). **Compendium of raspberry and blackberry diseases and insects**. **American Phytopathology Society-APS** Press, 2ª ed. pp.11-22.

ELSAS, J.D.; DUARTE, G.F.; ROSADO, A.S.; SMALLA,K.( 1998).Microbioloical and Biologycal methods for monitorring microbial methods. Washington, D.C. v. 32.133-158.

EMATER/RS-ASCAR. Associação Riograndense de Empreendimento e Assistência Técnica e Extensão Rural. **Diagnóstico da Fruticultura**. Vacaria: EMATER/RS- ASCAR, 2010.

ESPOSITO ,E.; AZEVEDO, J. L: organizadores. **Fungos: Uma introduçãoa biologia, bioquímica e CAXIAS DO SUL**. EDUCS. 2004. 510P

FACHINELLO, J.C. (2008). MIRTILO. Revista Brasileira de Fruticultura.Jaboticabal, SP.Ed. FCAV, Unesp,V.30, n.2, p.285-288.

FISHER, D. L. O.; FACHINELLO, J. C.; ANTUNES, L. E. C.; TIMM, C. R. F.; GIACOBBO, C. L.; TOMAZ, Z. F. P. Enraizamento de Miniestacas de mirtilo (*Vaccinium ashei* read). In: III Simpósio Nacional do Morango II Encontro Sobre Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul. **Resumos**. p. 162-167.

FISHER, D. L. O.; FACHINELLO, J. C.; ANTUNES, L. E. C.; L. E. C.; TOMAZ, C. L. C. (2008). Efeito do Ácido Ildolbutírico no enraizamento de estacas lenhosas de mirtilo. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, SP. Ed. FCAV, Unesp, V.30, n.2, V.30, n2, p.285-289

FLEURI, L. F; SATO, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. *Quim. Nova*. v. 28, n. 5, p. 871, 2005.

FOKKEMA, N.J. Opportunities and problems of control of foliar pathogens with micro-organisms. **Pesticide Science**, [S.I. s.n.], v.37(4), p.411-416, 1993.

FORTES, F. O.; SILVA, A. C. F.; ALMANÇA, M. A. K.; TEDESCO, S. B. Promoção de enraizamento de microestacas de um clone de *Eucalyptus 110G*. Por *trichoderma 110G*. **Revista Árvore**. Viçosa [s.n.] V.31, n. 2. 2007.

FRAVEL, D. 2008. Commercialization of biocontrol agentst for use against plant patógens. *Summa phytopatologica*. 34: 193.

FREEMAN, S. et al. Genetic diversity within *Colletotrichum acutatum sensu* Simmonds. **Phytopathology**. v.91, n.6, p. 586-592, 2001

FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. **Biotecnologia – Ciência & Desenvolvimento**. Uberlândia, v. 3, n. 14, p. 12-16, maio/jun., 2000.

GALVAGNO, M. A.; FORCHIASSIM, F. Fisiologia dos Fungos: Nutrição e Metabolismo. In Azevedo J.L. & Esposito, E. **Fungos: Uma introdução a Biologia, Bioquímica e Biotecnologia**. Caxias do Sul. EDUCS. 2004, P125- 169.

GHINI R.; KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, SP, 2002. 78p, II.

GOMES, J. C. C. (1999), **Pluralismo metodológico das revoluções científicas**. São Paulo: Perspectiva S.A., 2ª ed., 257p.

GODOY, P.; COLOMBO, A. L. Biologia e relevância clínica das espécies do gênero *Fusarium* spp. **Prática Hospitalar**, v. 11, n. 34, p.136-140. 2004.

GULLINO, M. L. e GARIBALDI, A. situation actuelle ET perspectives d'avenir de La lute biooique e intégrée contra La pourritura de La vigne em Italie. In Colloque de La Soceité Française de Phytopathologie, 24, 1983, Bordeaux. **Les antagonismes microbes**. INRA, 1983. Pp91-97. (Les Colloques de l'INRA, 18)

GULLINO, M. L., GARIBALDI, A. Biological and integrated controlo f *Botrytis cinerea* in Italy: Experimental Results and Problems. **Quaderni della Scuola di Specializzazione in Viticoltura ed Enologia**, Torino, v9, pp 299- 308, 1985.

GULLINO, M.L. Controlo f *Botrytis* roto f grapes and vegetables withi *Trichoderma* spp. In: E. C. TIJAMOS, G. C. PAPAIVIZAS, COOK, R. J. ,**Biological Controlo f Plant Diseases: Progress and Challenges for the Future.**, NY: (Eds) Plenum. 1992. p. 125-132.

GULLINO, M. L.; LEROUX, P.; SMITH, C. M. 2000. Used and challenger of novel compouds for plant diseases control. Crop Protection. 19: 1-11

GUIMARÃES, S.E; FERNANDEZ, R. de C. (2008) *Trichoderma* no sistema radicular de milho. Jornal da Associação gaúcha de produtoras de maçã.[s.n.] 168: 12.

GRAUME-COOK, K.A.; FAULL, J. L.; (1991). Effect of ultraviolet-induced mutants of *Trichoderma harzianum* with altered production on selected pathogens in vivo. **Canadian Journal of Microbiology**. 47: pp. 659- 664.

GRIMALDI, F.; GROHSKOPF, M. A.; MUNIZ, A. W.; GUIDOLIN, A.F. (2008). Enraizamento *in vitro* de frutíferas da família das rosáceas. Revista de Ciências Agroveterinárias. Lages, SC. V. 7, n2. p. 160-168.

HANNUSCH, D.J. & BOLAND, G.J. Influence of air temperature and relative humidity on biological control of White mold of bean (*Sclerotinia sclerotiorum*). Phytopathology 86:156-162. 1996.

HAWKSWORTH, D.L., KIRK, P.M., SUTTON, B.C.; PEGLERr, D.N. 1995. Ainsworth & Bisby.s Dictionary of theFungi. 8th. edn., CAB International, Wallingford, UK, 616 pp

HENRIQUES,A. **Thomas Robert Malthus: A Teoria Malthusiana.** Instituto politécnico de coimbra, instituto superior de engenharia de coimbra, departamento de engenharia civil. junho de 2007.

HOFFMAN, A.; PAGOT, E.; POLTRONIERE, E.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.(2005) Pequenas frutas na região de Vacaria, RS: um breve histórico.III Seminário Brasileiro sobre Pequenas Frutas, Embrapa CNPUV, Bento Gonçalves, Anais Doc.53:11-15

HOWELL, C. R. (1998) The role antibiosis in biocontrole. In Harman, G.E.; Kubicek, C.P. **Trichoderma and Gliocladium. Enzymes, Biological Control and Comercial Application.**, London: Taylor and Francis LTd., , Vol. 2. p. 173-183. 1998

HOWELL, C. R. ( 2006). Undertanding the Mrchanisms Employed By *Tricchoderma viriens* to Effect Biological Control of Cotton Diseases. Research Plant Patology. U.S. **American Phytopathological Society** . V. 96, n 2. Pp.178-180

HUANG, H.C., BREMER, E., HYNES, R.K. & ERICKSON, R.S. Foliar application of fungal biocontrole agents for the control of white mold by dry bean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. Biological Control 18:270-276. 2000.

HUNG, H.C.; LI, G. Q., KORKKO, E. G.; ACHARYA, S. N. Mycoparasitism of *Gliocladium roseum* on *Botrytis cinerea*: Ultrastrutural study of mycoparasitism of *Gliocladium roseum* on *Botrytis cinerea*. **Agriculture and Agri-food Canada**, Lethbridge research Centre, P.O.Box 3000, Lethbridge, Alberta TIJ 4B1, Canadá. Bot Bull. Acad. 2002, v.43: p. 11-218

ILLIPRONTI JR., R.A. & MACHADO, J.C. Antagonismo de fungos a *Sclerotinia sclerotiorum* em soja e feijão. Fitopatologia Brasileira 18:162-166. 1993. [ [Links](#) ]

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA – INMET. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Oitavo Distrito de Meteorologia- 8ºDisme. Seção de Observação e Meteorologia Aplicada – Seoma,- Porto Alegre – RS

INDEX FUNGORUM <http://www.indexfungorum.org> acessado em 19 de setembro de 2010

JANISIEWICZ, W.J. Post harvest biological control of blue mold on apples. **Phytopatology**, St Paul, v. 77, nº 3, p. 484-485, 1987.

JEED, G.; CHUA, N. H. 2000. A New self-assembled peroxal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane. *Nature- Cell- Biology*, 2: 226-231.

JENNINGS, D. H.; LYSEK, G. 1996. Fungal Biology understanding the fungal lifestyle. BIOS. Cientific Publishers. Oxford.156.

JUNIOR, F. B. C.; MENDES, C.; TEIXEIRA, K. R. S.; REIS, V. M. 2002. Uso de ferramentas em estudo de diversidade de microrganismos do solo. EMBRAPA, Planaltina, FDF. Doc. 51. 33p.

KOIKE, N.; HYAKUMACHI, M.; KAGEYAMA, K.; TSUYUMU, S.; DOKE, N. Induction of Systemic Resistance in Cucumber against Several Diseases by Plant Growth-promoting Fungi: 112G112controle112ns and Superoxide Generation. **European Journal of Plant Pathology** .2001, Vol. 107, n.5, p. 523-533.

KOVACH J, PETZOLDT R. AND HARMAN G.E., Use of honey bees and bumble bees to disseminate *Trichoderma harzianum* 1295-22 to strawberries for *Botrytis* control, *Biological Control* **18** (2000), pp. 235–24

KLIMCH, M. A. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. **Mycologia**, [s.n.], 2002, v.94, p.21-27.

KRAHE, A.; FILTER, C.; FERREIRA, K.; MARTINENKO, N. (2008). A Indústria brota nos Campos da serra. **Indústria em Ação**. Revista da Federação das Indústrias do Estado do Rio Grande do Sul. Sistema FIERGS, Porto Alegre. n15.pp.4-13.

KUHLS, K.; LIECKFIELDI. E.; SAMUEL, G. J.; MEYER, W>; KUBICEK, C. P.; BURNER, T. Revision of *Trichoderma* sect *longibrachiatum* including related telemorphs based on analysis ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycologia*, v.89:442-460, 1997.

KURAKOV, A. V.; NECHITAILO, T. Yu.; GOLYSHIN, P. N.; ZVYAGINTSEV, D.G. **diversity of facultatively anaerobic microscopic Mycelial Fungi in Soils**. Microbiology, vol. 77, Nº1, pp 90-98. 2008

KUTER, G. A.. Microfungal populations associated with the decomposition of sugar maple leaf of litter. **Mycologia**, ,[ s.n.], 1986, v.78, p.114-126



KUYKENDALL, L.D.& ELKAN, G.H. *Rhizobium* derivatives differing in nitrogen-fixing efficiency and carbohydrate utilization. [S.I.]Appl. **Environmental Microbiology**, 32:511-519, 1976.

KRIOKORIAN, R.; SHIDLER, M.D.; NASH, T.A.; KALT, W.; Melinda R. VINGVIST-TYMCHUK, M. R.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J. A.; **Blueberry Supplementation Improves Memory in Older Adults**<sup>†</sup>. *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, 58 (7), pp 3996–4000

LAING, R.D. (1972), “Metonoia: some experiences at Kingsley Hall, :” in Ruitenbeek H.M: Going crazy: the therapy of D. Laing and others, Bantan, Nova York

LISBOA, B. B.; BOCHESSE, C.C.; VARGAS, L.K.; SILVEIRA, J.R.P.; RADIN, B.; OLIVEIRA, A. M. R. . Eficiência de *Trichoderma harzium* e *Gliocladium viride* na redução da incidência de *Botrytis cinerea* em tomateiro cultivado sob ambiente protegido. **Ciência rural**. Sta Maria.2007, v. 37, n.5, p.1255-1260.

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**, v.43, p.211-218,

LOPES, R.B. (2009). A Indústria no Controle Biológico: Produção e Comercialização de microrganismos no Brasil. **IN. Biocontrole de Doenças em Plantas: Uso e Perspectivas**.

LOVATO, P. E.; TROUVELOT, A.; GIANINNAZZI PEARSON, V.; GIANINNAZZI, S. Micorrização de plantas micropropagadas. In: SIQUEIRA, J. O. (ed.) **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, DCS/DCF, 1996. p.195-201.

LYR, H.; RUSSEL, P.E.; DEHENE, H-W.; SISLER, H.D. **Modern fungicides and antigungal compounds II**. [S.I.] Andover: Intercept, 1999. 578p

MACCHERONI, Jr. W.; ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S. Ecologia: Habitat e interações fúngicas com plantas, animais, fungos e bactérias. In Azevedo J.L. & Esposito, E. **Fungos: Uma introdução a Biologia, Bioquímica e Biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS. 2004, p.451- 490.

MAMARABADI, M.; JENSEN, D.F.; LÜBECK, M. Identification of the role of chitinases from the antagonistic *Clonostachys rosea* strain IK726 in biocontrol. In: European Conference on Fungal genetics7, 2004, **Anais**. Disponível em: [http://www.fgsc.net/ecfg7/Posters II Fungal Plantinteractions](http://www.fgsc.net/ecfg7/Posters%20Fungal%20Plantinteractions.pdf), pdf.

MARKHAM, P. 1994. **Occlusions of septal pores in filamentous fungi**. Mycol. Res, 98: 1089-1106

MARTINS-CORDER, M.P; MELO, I. S.; Kleb.. **ANTAGONISMO IN VITRO DE *Trichoderma* spp. A *Verticillium dahliae***. *Scientia Agricola*. Jaguariuna, SP. V. 55, n. 1, 1998.

MARTINS, M. K. **Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp. e estudo da interação com a planta hospedeira**. 2005. 110 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiros”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005

MELO, MARCO ANTÔNIO MACHADO FERREIRA DE (1997), **Da evolução do paradigma da agricultura ao paradigma da informação**. BuscaLegis.ccj.ufsc.br, ano 19, nº 35.

MELO I. S. Trichoderma e Gliocladium como bioprotetor de plantas. **Revisão anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, 1996, v.4, p.261-295

MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L.(1998) Controle Bológico EMBRAPA- CNPDA, Jaguariúna, SP. (1). pp 33-34

MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L.. (2000) Controle biológico, Jaguariúna:EMBRAPA, Meio Ambiente. p. 388

MENDOZA, L., ARAYA-MATURANA, R.; CARDONA, W.; DELGADO-CASTRO. T.: GARCIA, C.; LAGOS. C.; COTORAS, M. **2005. In vitro sensitivity of *Botrytis cinerea* to anthraquinone and anthrahydroquinone derivatives.** J Agric Food Chem. Dec 28;53(26):10080-4.

MENENDEZ, A.B. & GODEAS, A. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* attacking soybean plants. Degradation of the cell walls of this pathogen by *Trichoderma harzianum* (BAFC 742). Mycopathologia 142:153-160. 1998. [ [Links](#) ]

MEYER, G. *et al.* Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T 39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. **European Journal of Plant Pathology**. [s.n.] v. 104, p. 279-286, 1998.

MILLS, P. R.; Sreenivasaprasad, S.; Brown, A. E. detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **FEMS Microbiology Letters** 98: 137-143. 1992.

MOON, P. Vai Faltar Comida. Jornal época. Ed Globo. SP. 6 jun.pp 94-99. 2011

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J.O.. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. 2ªed, Lavras MG: Ed UFLA, 2006, v.7, p.98.il.

MORANDI, M. A. B. (2001). **Influência dos fatores bióticos e abióticos no estabelecimento de *Clonostachys rosea* em tecidos de roseira e controle biológico de *Botrytis cinerea* pelo antagonista em restos culturais**. 71f. tese( Doctor scientiae) programa de Pós- Graduação em Fitopatologia, faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.2001.

MORANDI, M. A. B., 2002, **CONTROLE BIOLÓGICO DE *Botrytis cinerea* COM *Clonostachys rosea*: Uma Ferramenta valiosa no manejo do Mofo cinzento**. Embrapa Meio Ambiente, , Jaguariúna, SP .C.P. 69; 13820-000

MORANDI, M. A. B.; MAFFIA, Z. A.; MIZUBUTI, E. G.; ALFENAS, A .C.;BARBOSA, J. G.. Supression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris. A valuable component B. blight management in commercial greenhouses. **Biological Control** . v.26, p. 311-317. 2003

MORANDI, M.A.B & BETIOL, W. Controle Biológico de doenças de plantas no Brasil. IN **Biocontrole de doenças em Plantas: Uso e perspectivas**, Betiol, W. & Morandi, M.A.B.(organ). 2009. EMBRAPA e FundaAg. Pp 7-14

MULLEN, M.D. & WOLLUM II, A.G. Variation among different cultures of *Bradyrhizobium japonicum* strains USDA 110 and 122. *Can. J. Microbiology*, 35:583-588, 1989.

MUTHUKUMAR T.; UDAIYAN K.; RAJESHKANNAN V. Response of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) to indigenous arbuscular mycorrhizal fungi, phosphate-solubilizing and asymbiotic nitrogen-fixing bacteria under tropical nursery conditions. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 34, p.417-426. 2001.

NEVES, M. C. P.; RUNJANEK, N.: Ecologia das bactérias diazotróficas em solos tropicais. In Melo, Itamar Soares & Azevedo, João Lúcio **Ecologia Microbiana**. EMBRAPA Jaquariúna: .Ed Ecologia, 1998, 488p

NOBRE, S.A.M.; MAFFIA, L.A.; MIZUBUTLE, S.G. Seleção of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. **Biological Control**, Orlando, v.34, n2, p. 132-143, 2005.

NORONHA, E. F.; ULHOA, C. J. Characterization of a 29-KDa  $\beta$ -1,3 glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Microbiol. Lett.* v. 183, p. 119, 2000

OLIVEIRA, D.E.C.de; SILVA, A.V.da; ALMEIDA, A.F.de; SIA, E. de F. Resposta da inoculação de fungos micorrizos e rizóbio no crescimento inicial de *Acacia mangium* em solo de mineração no estado de Goiás. **Nota técnica** Engenharia na Agricultura. 2011.; Viçosa, MG, V.19 N.3, MAIO / JUNHO 2011 219-226 p

POHANK, A.; CAPIEAU, K.; BROGERG, A.; STENLID, J.; STRESTRÖN, E.; KENNE, L. 2004. Enrichment of fusarium sp. Strain F31 and their inhibition of botrytis cinerea spore germination. *Journal of natural Products*. 67: 857-857

PAGOT, E.; HOFFMAN, A. Produção de pequenas frutas no Brasil. In: I Seminário Brasileiro sobre Pequenas Frutas. 2003, Vacaria, RS. **Anais**. Bento Gonçalves\; Embrapa Uva e Vinho. Doc 37. 2003. 64p.

PAGOT, E.; POLTRONIERI, E. (2004). Diagnóstico de produção e comercialização de pequenas frutas no Brasil. In: II seminário brasileiro sobre pequenas frutas Vacaria, RS. **Anais** Bento Gonçalves Embrapa Uva e Vinho pp. 9-19.

PAGOT, E. . **Cultivo de pequenas frutas: amora preta, Framboesa e Mirtilo**. Porto Alegre: EMATER/ RS- ASCAR, 2006, p.41.:115G.

PAGOT, E. **Direcionadores de valor crítico na cadeia produtiva de pequenas frutas em Vacaria/ RS**. 2010.p54. Monografia (Especialização em Gestão do Agronegócio), MBA em Gestão do Agronegócio da Universidade do Vale do Rio dos Sinos.RS.2010.

PAPAVIZAS, G. C . *Trichoderma* and *Gliocladium* : Biology, ecology, and potencial for biocontrol. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.23, p.23-54, 1985.

PENG, G.; SUTTON, J. C. (1991). Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in raspberry. **Canadian Journal of Plant Pathology** 13:247-257

PERES, A. P. et al. Variabilidade morfo cultural e genética de fungos associados à podridão peduncular do mamão. **Ciênc. agrotec.**, Lavras. v.27, n.5, p.1053-1062, set./out., 2003.

PEREZ,K. S. S.; RAMOS, M. L. G.;Mac MANUS,C. Nitrogênio da biomassa microbiana em solo cultivado com soja, sob diferentes sistemas de manejo nos cerrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. V.40. n. 2. P. 137-144, fev. 2005.

POLTRONIERE, E. (2003). Alternativas para o mercado interno de pequenas frutas. I Seminário brasileiro sobre pequenas frutas no Brasil. **Anais**. Pp 39-40. Vacaria, RS.2003.

PUNJA, Z.K. & UTKHEDE, R.S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, v.21(9), p.400-407, Sept. 2003.

PUNJA,Z. K.; Yip, R. Biological control of damping-off and root rot caused by *Phthium aphanidermum* on greenhouse cucumber. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 25, p 411-417, 2003.

RAO, P.S.C.; MANSELL, R.S.; BALDWIN, L.B.; LAURENT, M.F. Pesticides and their behavior in soil and water.[S.I.]. **Soil Science Fact Sheet**. 1983

RASEIRA, M.C.B.; GONÇALVES, E.D.G.; TREVISAN, R.; ANTUNES, L.E.C.Aspectos técnicos da cultura da framboeseira. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. 2 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 120).

REDMON, J.C.; MAROIS, J.J.; MAC DONALD, J.D. (1987). Biological control of *Botrytis cinerea* on roses with epiphytic microorganisms. **Plant Disease**, **71(9)**:799-802.

REETZ, E.R. *et al.* (2007). **Anuário brasileiro de fruticultura 2007 / ERNA**. Santa Cruz do Sul :[s.n.]

REIS,E. M.( 1991). **Solos Supressivos e seu aproveitamento no Controle de Doenças em Plantas**. In Controle Biológico de Doenças e Plantas org Bettiol,W. EMBRAPA, CNPDA. Jaquariúna. SP. capXI, pp 181-193.

RICARD, J. L.; RICARD, T. J. The ethics of biofungicides- A case study: *Trichoderma harzanium* ATCC 20 476 on Elsanta Strawberry against *Botrytis cinerea* ( Gray mold). **Agriculture an Human Values**, 14: pp 251- 258. 1997

ROBALDI,C.V.; TOBOLA, C.S.; FACHINELLO, J.C.;SILVA, J.A. ( 2007). Percepção de consumidores do Rio Grande do Sul em relação a quesitos de qualidade em frutas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, SP,vol 29, nº 3,p 681-684.

ROBISON, R. K.; BATT, C. A.; PATEL ,P. D. **Encyclopédia of food microbiology**. San Diego: Academic Press,. 2000.

RONQUE, E.R.V. **A Cultura do Morangueiro**. EMATER-PR, 206p., Curitiba, 1998.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI,R.; HORN, G. I.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-Directed enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polimerase. *Science* 239 (1988)

SALGADO, M.J. O emprego da amora, framboesa, mirtilo e morango na redução de risco de doenças, n. 1, 2003. **Anais**. Vacaria R/S: I Seminário de Pequenas Frutas no Brasil, 2003, p.36.

SAMUELS ,G. J *et al.* 2001. Perithecial species of *Fusarium*. pp. 122-137 en: *Fusarium*. Summerell BA *et al.*,eds. APS Press, St. Paul.

SCHÄFER, C., WÖSTERMEYER, J. Random primer dependent PCR differentiates aggressive from non-aggressive isolates of the oilseed rape pathogen *Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*). **Journal Phytopathology**. v.136, p.124-136, 1992.

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

SCHOERS, H. J ., 2001. A monograph of *Bionectria* (Ascomycota, Hypocreales,Bionectriaceae) and its *Clonostachys* anamorphs. *Studies in Mycology* 46. CBS Utrecht, pp. 1-214.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. cluster analysis method for grouping means in the analyses of variance.[S.I].**Biometrics**, v.30, p.505-12, 1974.

SEIFERT, K. 2001. *Fusarium* and anamorph generic concepts. pp. 15 - 28 en: *Fusarium*. Summerell BA *et al.*, eds. APS Press. St. Paul, Minnesota

SHI, Y.; CORREL, J. P.; GUEBER, J.C. Frequency of *Colletotrichum* species causing bitter rot of apple in the Southeastern United States. **Plant Disease** 80: 692-696, 1996.

SILVA-RIBEIRO, R.T. ( 2001). **Avaliação de cinco linhagens de *Trichoderma sp.* como agentes controladores do fitopatógeno *Botrytis cinerea***. 81p.Tese de doutorado. Programa de Pós graduação em Ciências Biológicas- Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

SILVA, S. D. A.; ANTUNES, L. E. C.; ANTHONISEN, D. G.; LEMÕES, J. S.; GONÇALVES, E. D. Caracterização de genótipos de mirtilo utilizando marcadores moleculares. (2008). **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal. SP, v.30, n.1, p.180-184

SILVA, I. C. **Manejo Ecológico de pragas: resíduos, controle biológico e natural**. <http://www.esam.br/gvaa/publicacao/gr11-05-01.pdf> > Acesso em:10 jun. 2003.

SILVERA-PEREZ, A. E. Controle Biológico do mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) com *Clonostachys rosea* em cultivos experimental e comercial de mudas de fúccia. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Agronomia. Programa de Pós-graduação em Fitotecnologia. Porto Alegre. 2006.

SILVERA- PEREZ, A. E.; VALDEBENITO- SANHUEZA, R. M.; DUARTE; V.;SSANTOS, H. P.; FELIPPETO, J. Controle do Mofo Cinzento com *Clonostachys rosea* na produção de mudas de fúccia.**Tropical Plant Patology**. .[S.I.s.n.] V 35 (3), p 163- 169. 2010

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**. New Delhi, v.41, n.2., p.237-245, 1981.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L., ASTOLTI FILHO,S.;BELÉM PINHEIRO, M. L.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA,J. Q. (2004). Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos

isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Policourea longiflora* rich e *Strychnos cogens bentham*. **Acta Amazônica**. 34(2): 185-195.

STEVEN J. COULTRAP, P. MICHAEL, D. BROWING; Share this item Blueberry-enriched diet ameliorates age-related declines in NMDA receptor-dependent LTP BIOMEDICAL AND LIFE SCIENCES ,AGE ;Volume 30, Number 4, 263-272, DOI: 10.1007/s11357-008-9067-y

SUTTON, J.C.; PENG, G.(1993) Biocontrolk of Borytis cinerea in Strawsberry leaves. Phytopathology, St. Paul, v.83, n 6, p.615-621.

SUTTON, J. C. Biological control of strawberry diseases: Departament of Enviromental Biology in strawberry Research. **Advances in strawberry research**,[S.I.s.n] v.13, p.1-8. 1994

SUTTON, J. C.; YU, H. Morphological development and interations of *Gliocladium roseum* and *Botrytis cinerea* in rasperry. **The Canadian Phytopathological Society**. 1997, v.19 (3), p. 237-336.

SUTTON,J.C.; LI,DEWEI; Peng,G.;YU,H.; ZHANG.;VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. *Gliocladium roseum*: a versatile adversary of *Botrytis cinerea* incrops. **Plant Disease**, Ontário, v.81, p.316-328, 1997

STEYN, P. S. Mycotoxins, geral view, Chemistry and strutura- **Toxicology letters**, 1995-82/83; 843- 851.

STRALIOTTO, R. & RIMJANEK, N.G. **Aplicação e Evolução dos Métodos Moleculares para o Estudo da Biodiversidade do Rizóbio**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, nov. 1999. 58p.

STUESSY, T. D. 1990. Plant taxonomy: The sistematic evaluation of comparative data. Columbia university Press, New York, 514 p.

TALAMINI, V.; STADINIK, M.J. (2004). Extratos Vegetais e de Algas no Controle de Doenças de Plantas.**Manejo Ecológico de Doenças de Plantas**.Florianópolis, SC: CCA/UFSC, P.45-62.

TALHINHAS, P. Genetic and Morphological Characterization of *Colletotrichum acutatum* Causing Anthracnose of Lupins. **Phytopathology**, v. 92, n. 9, p.986-996, 2002.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHENEN, H. VOLKWEISS, S. J. Análise Solo, Plantas e outros materiais. Boletim **técnico**. Departamento de Solos, faculdade de Agronomia, UFRGS. POA. RS:2ª 118G, n. 50, 1995

THINES, E.; ANK, H.; WEBER, R. W. S. 2004. Fungal secondary metabolites as inhibitions of infection related morphogenesis in phitopathogenene fungi. Mycological Research. 108: 14-25.

TRONSNO, A. Biological and integrated controls of *Botrytis cinerea* on apple with *Trichoderma harzianum*, **Current Microbiology**. 1991, v.23, p. 285-289

VALDEBENITO-SANHUEZA, R (1991). **Práticas Agrícolas e sua Influência no Controle Biológico de Doenças.** In Controle Biológico de Doenças e Plantas. org Bettiol, W. EMBRAPA, CNPDA, Jaquariúna. SP. capXII, pp185-200.

VALDEBENITO- SANHUEZA, R. M.; SUTTON, J.; PERAZZOLO, I.; CSERMAISKI, A. B. C. (1997a) Controle Biológico de Botrytis cinerea em morangueiros cultivados em estufa. **Fitopatologia Brasileira**. 22:p. 69- 73

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; SUTTON, J.; PERAZZOLO I.; CSERMAISKI, A. B. C. Controle do mofo cinzento com o fungo *Gliocladium roseum* em culturas protegidas de morangueiros. **Comunicado técnico EMBRAPA-CNPUV**, n 22, p. 1-8, 1997

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M (2000). Leveduras para o Biocontrole de Fitopatógenos. **Controle Biológico**. Editores Melo I.S. ;Azevedo, J.L.-EMBRAPA Meio Ambiente, jaguariúna, SP. 388p

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M Doenças de importância potencial para os pequenos frutos no Sul do Brasil. SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS, 2., Vacaria. Documentos, 4. ANAIS. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. P 79-91.

VALDEBENITO-SANHEZA, R. M.; ZAMBONI-PINOTTI, M.M.; PEREZ, A. E. S. (2007a) Avaliação do efeito protetor e curativo de antagonistas a patógenos que colonizam folhas. **Métodos Utilizados no Biocontrole de Fitopatógenos**. Editores.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; DALL'ONDER, G. (2007) Multiplicação de *Clonostachys rosea*. **Métodos Utilizados no Biocontrole de Fitopatógenos**. Editores Valdebenito- Sanhueza, R. M.; Melo I.S. EMBRAPA Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS. Pp 35- 37.

VALDEBENITO- SANHUEZA, R. M.; MELO I.S. EMBRAPA Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS. Pp 31- 33 Valdebenito-Sanhueza. Produção de morangos no sistema semi-hidopônico Versão eletrônica. EMBRAPA CNPUV. Sistemas de produção, 15. Dez/2008

VERO, S. MONDINO, P. Controll biológico de enfermedades de plantas. In: Dominguea, A.; Prieto, R. (Ed) **Perfil Ambiental del Uruguay**. Montevideo. Nordan, 2002. P. 81- 97. 2002.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E.L.; MARRA, R.; WOO, S.L.; LORITO, M. (2007). **Trichoderma- plant- pathogen interactions**. Soil biology & Biochemistry, Ed Elsevier Ltda, 40: 1-10

YOHALEM, D. S. . Evaluation of fungal antagonist for grey mold management in early growth of pot roses. **Association of Applied Biologist**. 2003. v.144, p. 9-15.

YOHALEM, D. S.; Nielsen, K.; Green, H.; Jensen, D. F. Biocontrol agents efficiently inhibit sporulation of *B. aclada* on necrotic leaf tips but spread to adjacent living tissue is not prevented. **Microbiology Ecology**. 2004. v.47.p 297-303.

YU, H.; SUTTON, J.C. (1997). Morphological development and interactions of *Gliocladium roseum* and *Botrytis cinerea* in raspberry. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontário, v.19, n 3, p 237-246.

YU, H.; SUTTON, J.C. (1998). Effects of inoculums density, wetness duration, temperature on control of *Botrytis cinerea* by *Gliocladium roseum* in raspberry. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontário, v.20,n 3,p 243-252.

WARDLE, D.A.; PARKINSON, D.; WALLER, J. E. (1993). Interspecific competitive interactions between pairs fungal species in natural substrates. **Oecologia** 94: pp. 165- 172.

WARGOVICH, M. J.. Red fruits s functional foods for the prevention of cancer. EMBRAPA: **Doc** 167. 2006., Pelotas RS

WELL S. H. D. *Trichoderma* as a G120controle agent. In. Mukerji, K.G., Garg, K. L. **Biocontrol of Plants Diseases**, Boca Raton: CRC Press, 1988, v.1, p. 71-82.

WILLIAMSON, P. TUDZYNSKI AND N. DELEN ,(2007) Editors, *Botrytis: Biology Pathology and Control*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease, *Molecular Plant Pathology* **8** (2007), pp. 561

ZAMBONI-PINOTTI, M. M ;VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.( 2004).Avaliação do efeito antagônico de isolados de *Clonostachys rosea* a *Botrytis cinerea* em folhas destacadas de morangueiro e framboeseiro. In:CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA, 2.; SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE AGROECOLOGIA 5.; SEMINÁRIO ESTADUAL SOBRE AGROECOLOGIA 6., Porto alegre. Anais Porto Alegre: EMATER, 2004. C749a. 1 CD-ROM.

ZAMBONI-PINOTTI, M.M.; VALDEBENITO- SANHUEZA, R. M.; CAPALBO, D. Antagonismo de *Clonostachys rosea* a *Botrytis cinerea* em folhas destacadas de morangueiro, framboeseiro e amoreira. *Summa Phytopathologica*, v. 31 suplemento, p. 181, 2005. Trabalho apresentado, Congresso paulista de Fitopatologia, 28, 2005, São Paulo.

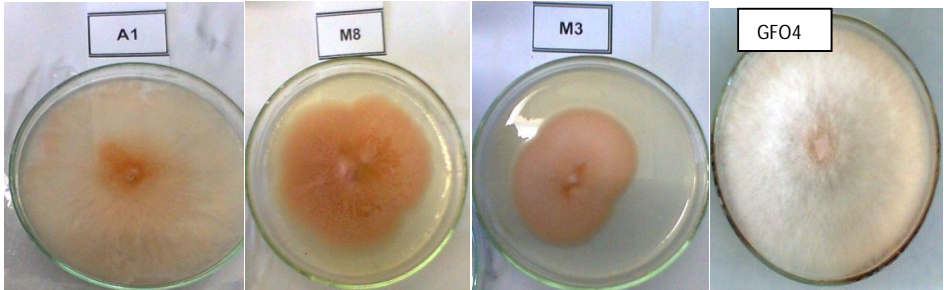
ZAMBONI-PINOTTI, M. M . **Seleção de fungos endofíticos em fruteiras e flores**. In Métodos Utilizados no Biocontrole de Fitopatogens . Organização: VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; MELO, I. S. EMBRAPA, CNPUV. Bento Gonçalves, RS. 2007.

ZAZZERINI, A. & TOSI, L. Antagonistic activity of fungi isolated from sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology* 34:415-421. 1985. [ [Links](#) ]

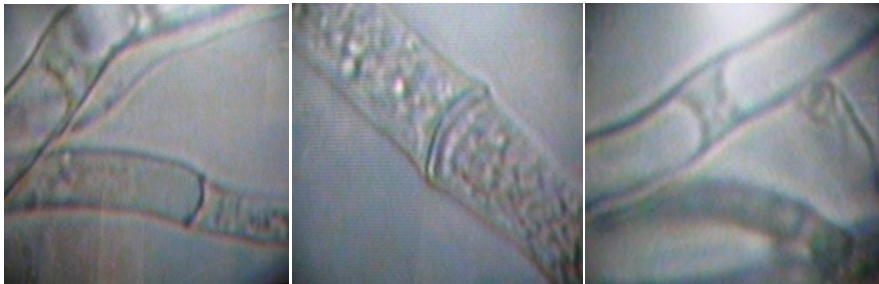
ZOU, C-G. ;Tu, H-H.; LIU, X-Y.; TAO, N.; ZHANG, K-Q. **Pac in the nematophagous fungus *Clonostachys rosea* controls virulence to nematodes**.*Environmental microbiologic* (2010) 12 (7), 1868-1877 doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02191.x © Society 2010 para Microbiologia Aplicada e Blackwell Publishing Ltd



11. ANEXOS



Anexo 1- Cor de colônias dos isolados A1, M8 e M3 comparados com o isolado *C. rosea* GFO4



Anexo 2 - Septos visualizados nos isolados A1, M3 e M8, respectivamente.

M3.2	-----AACCCCTGTGA-CATACCACTTGTGCCTCGGCGGA 35
A1.1	-----TCCCAACCCCTGTGA-CATACCAATTGTTGCCTCGGCGGA 39
GFO4.2	-----AACCCATGTGA-CATACCTATTGTTGCTTCGGCGGG 35
M8.1-	-----TCCAACCCCTGTGA-CATACCACTTGTGCCTCGGCGGA 38
OUTGROUP	ATTAGACAAGTTATCTAACTCCCAAACCCATGTGAACTTACC-ACTGTTGCCTCGGCAGA 59
*****	
M3.2	T-CAGC-----CC----GC-----TCC---CGG---TAAAACGGGACGG- 63
A1.1	T-CAGC-----CC----GC-----TCC---CGG---TAAAACGGGACGG- 67
GFO4.2	A-TTGC-----CCCGGGCGC-----CTC---GCG---TGCCCCGGATCAGG 69
M8.1-	T-CAGC-----CC----GC-----TCC---CGG---TAAAACGGGACGG- 66
OUTGROUP	TGTTGCTGGGCGAACCTACCCTGTAGCGAGCTACTCTGTAGCGACCTACCCGGGAACGGC 119
**        **        *	
M3.2	-----CCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTCTGAGT 110
A1.1	-----CCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTCTGAGT 114
GFO4.2	-----CGCCCGCT-AGGAACCTTAACTCTTGTTTATTTGAATCTTCTGAGT 117

```

M8.1- -----CCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGT 113
OUTGROUP   TTACCCTGTAGCGCCTGCCGGTGGACTACTAAACTCTTGTTATTTTAAGTAATCTGAGC 179
          *** ** * * *
M3.2      AAAACC-ATAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAA 169
A1.1      AAAACC-ATAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAA 173
GFO4.2    AGTTTTTACAAATAAATAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAA 177
M8.1-     AAAACC-ATAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAA 172
OUTGROUP   GTCTTATTTTAATAAGTCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAA 239
          *****
M3.2      GAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT 229
A1.1      GAACGCAGAAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT 233
GFO4.2    GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT 237
M8.1-     GAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT 232
OUTGROUP   GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT 299
          *****
M3.2      TGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAA 289
A1.1      TGAACGCACAGTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAA 293
GFO4.2    TGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAA 297
M8.1-     TGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAA 292
OUTGROUP   TGAACGCACATTGCGCCCATAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAA 329
          *****
M3.2      CCTCAAGCAC---AGCTTGGTGTGGGACTCGCG--TTAATTCGCGT----- 332
A1.1      CCTCAAGCCC---AGCTTGGTGTGGGACTCGCGAGTTAAATCGCGT----- 338
GFO4.2    CCTCATGCCCCTAGGGCGTGGTGTGGGGATCG--GCCAAAGCCCGCAAGGGACGGCC 354
M8.1-     CCTCAAGCGC---AGCTTGGTGTGGGACTCG-----CG----- 324
OUTGROUP   CCTTAAAGCCT---AGCTTAGTATTGGGAAGTGGC--TTTACTGCCAT----- 402
          **** * * *
M3.2      --TCCTCAAATTGATTGGCGGTCACGTCG-AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAACCCCTCG 389
A1.1      --TCCCAAATTGATTGGCGGTCACGTCG-AGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAACCCCTCG 395
GFO4.2    GGCCCTAAATCTAGTGGCGGACCCGTCGTGGCCTCCTCTGCGAAGTAGTGATATTC-CG 413
M8.1-     -----
OUTGROUP   --TCCTCAAATTCAACGGCGGATTATAGCAATCTCTG-AACGTAGTAATTTTTTCTCG 459

M3.2      TTA CTGTAATCGTCGCGGCCACGCCGT-TAAACCC---AACTTCTGAATGTTGACCTC 445
A1.1      TTA CTGTAATCGTCGCGGCCACGCCGT-TAAACCC---AACTTCTGAATGTTGACCTC 451
GFO4.2    C-ATCGGAGAGCGATGAGCCCTGCCGT-TAAACCC---AACTTCTAAGGTTGACCTC 469
M8.1-     -----

OUTGROUP   TTTTGAATACTGTAAACCTCAGCCGCATAAACCCCCCAGATTTTAAATGGTTGA---- 515
M3.2      GGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA 486
A1.1      GGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA 492
GFO4.2    AGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA 510
M8.1-     -----
OUTGROUP   -----
CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment Sem outgroup
M3.2      ---AACCCCTGTGACATACCACTTGTTGCCTCGGCGGATCAGCCC-----GCTCCCGGT 51
A1.1      TCCCAACCCCTGTGACATACCAATTGTTGCCTCGGCGGATCAGCCC-----GCTCCCGGT 55
M8.1-     -TCCAACCCCTGTGACATACCACTTGTTGCCTCGGCGGATCAGCCC-----GCTCCCGGT 54
GFO4.2    ---AACCCATGTGACATACCTATTGTTGCTTCGGCGGGATTGCCCCGGGCGCCTCGCGT 56
          *****

```

Anexo 3. Alinhamento das sequências, onde A1 é o isolado obtido de amoreira, M3 e M8 obtidos de mirtilleiro, GFO4 corresponde a *C. rosea* isolado pela Embrapa CNPUV e OUTGROUP é uma sequência de *Cucumis* sp utilizada para enraizar a árvore na análise filogenética.