

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS JABOTICABAL

CONTROLE BIOLÓGICO COMO COMPONENTE DO
MANEJO INTEGRADO DE DOENÇAS FÚNGICAS EM
BEGÔNIA

Miriam Fumiko Fujinawa

Engenheira Agrônoma

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS JABOTICABAL

CONTROLE BIOLÓGICO COMO COMPONENTE DO
MANEJO DE DOENÇAS EM BEGÔNIA

Miriam Fumiko Fujinawa

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Goes

Coorientador : Dr. Marcelo Augusto Boechat Morandi

Coorientadora: Profa. Dra. Káthia Fernandes Lopes Pivetta

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutora em Agronomia
(Produção Vegetal)

2013

F961c Fujinawa, Miriam Fumiko
Controle biológico como componente do manejo integrado de
doenças fúngicas em begônia. / Miriam Fumiko Fujinawa. –
Jaboticabal, 2013
vi, 79 p. ; il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013

Orientador: Antonio de Goes

Orientador: Marcelo Augusto Boechat Morandi

Coorientadora: Káthia Fernandes Lopes Pivetta

Banca examinadora: Rita de Cássia Panizzi, Edson Luiz Furtado,
Adelmo Golynski, Helson Martins do Vale

Bibliografia

1. *Begonia elatior*. 2. *Botrytis cinerea*. 3. *Clonostachys rosea*. 4.
Myrothecium roridum. 5. *Trichoderma asperellum*. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.937:635.91

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MIRIAM-FUMIKO-FUJINAWA, filha de Mitsugu Fujinawa e Lucia Watanabe Fujinawa, nasceu em 10 de setembro de 1982, na cidade de Suzano - São Paulo. Ingressou em 2002, no curso de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa MG, graduando-se em Engenharia Agrônômica em julho de 2007. Durante o período de graduação, estagiou no Laboratório de Bacteriologia II, na Unidade de Pesquisa e Conservação de Bromeliaceae e na Empresa Júnior de Agronomia. No primeiro semestre de 2005 participou de um intercâmbio em Minnesota - USA pelo programa CAEP (Communicating for Agriculture Exchange Program). Em agosto de 2007, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia na mesma Universidade, sob orientação do professor José Rogério de Oliveira, tendo a sua conclusão em julho de 2009 com a dissertação intitulada “Caracterização de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae* e avaliação de defensivos agrícolas no controle da mancha foliar bacteriana em begônia”. Em agosto de 2009 ingressou no curso de Doutorado em Agronomia-Produção Vegetal na Universidade Estadual Paulista, Câmpus Jaboticabal-SP, sob orientação do professor Antonio de Goes, como bolsista CNPq. Iniciou os ensaios da tese no segundo semestre de 2010 na Embrapa Meio Ambiente, em Jaguariúna-SP, sob coorientação do pesquisador Marcelo Augusto Boechat Morandi, submetendo-se a defesa da tese em 16 de abril de 2013.

“E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.”

Coríntios 13:2

Dedico

A meus pais **Mitsugu Fujinawa** e **Lucia W. Fujinawa**,
pelo amor, força, confiança e paciência para que mais uma
conquista fosse alcançada.

Ofereço

Aos meus irmãos **Massa, Jun, Mitsugu** e **Minoru**,
pela amizade, companheirismo, brincadeiras e apoio.

Ao meu noivo **Nadson**,
pelo amor, respeito, paciência, apoio que me ampararam nesta
etapa vencida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Câmpus Jaboticabal, pela oportunidade de realização deste curso que muito contribuiu para minha formação profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro durante a execução deste trabalho.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa CNPMA Meio Ambiente), pela concessão dos laboratórios, disponibilização de material, apoio científico para o desenvolvimento dos ensaios.

Ao orientador, professor Dr. Antonio de Goes, pelo apoio, ensinamentos científicos e paciência durante a execução deste trabalho.

Aos coorientadores, pesquisador Dr. Marcelo A. B. Morandi e a Prof^a. Dr^a. Káthia F. L. Pivetta, ensino, apoio, confiança e amizade durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Modesto Barreto (Tio), pelos ensinamentos e pela grande amizade.

Ao pesquisador Dr. Bernardo A. Halfeld-Vieira, pelas sugestões apresentadas durante a execução deste trabalho.

A todos os professores da Unesp em especial, Dr^a. Rita de Cássia Panizzi, Dr^a. Margarete Camargo e Dr. Jaime Maia dos Santos pelos ensinamentos.

A todos os pesquisadores da Embrapa Meio Ambiente, em especial, Dr^a. Maria Conceição P. Y. Pessoa, Dr^a. Jeanne S. Marinho-Prado, Dr^a. Kátia L. Nechet, Dr. Wagner Bettiol, Dr^a. Raquel Ghini, Dr^a. Simone S. Prado, Dr. Luiz Alexandre N. Sá e Dr. Luiz Antonio S. Melo, pela ótima convivência, amizade e por todo apoio.

À equipe do Laboratório de Quarentena Costa Lima e do Laboratório de Microbiologia Ambiental, Elen R. S. Agostini, Gilberto R. Almeida, Elke S. D. Vilela, Márcia M. Parma, Rosely S. Nascimento, Roberto A. A. Pereira, José Roberto Silva, Anamaria F. M. Dentzien, por todo apoio, ótima convivência e por ajuda dedicada a mim durante o curso de doutorado.

Aos membros da banca examinadora da qualificação e da defesa pela solicitude nas correções, sugestões e colaborações neste trabalho.

Aos meus pais, Mitsugu Fujinawa e Lucia Watanabe Fujinawa pela disposição de me ajudar, pelo carinho, educação e confiança.

Aos meus irmãos Sergio Massa Fujinawa, Luiz Jun Fujinawa, Luciano Mitsugu Fujinawa e Michael Minoru Fujinawa, pelo carinho, incentivo e amizade.

À minha tia Emília Watanabe e a família Yshida, pelo carinho e amizade.

Ao meu noivo Nadson de Carvalho Pontes pelo apoio, atenção, paciência, companheirismo e auxílio nas análises estatísticas e revisão.

Aos amigos da Embrapa, em especial, Daiana S. Cavasoti, Bárbara Giraldi, Débora F. Lazarin, Natalia F. Santos, Zayame V. Pinto, Abrahão Haddad, Cassiano Forner, Carlos Eduardo O. Silva, Andiale P. Santos, Fernanda R. O. Tozzi, Juliana Ferrari, Jéssica O. Silva, Thais B. Silva, Sharla Vidal, Thiago Brentegani pela ajuda e amizade durante esses anos.

Às amigas de República, Lonjoré L. Lima, Gisele S. Batista, Ronilda L. Aguiar, Ludmilla L. Cavallari e Evelynne U. Leão pela excelente convivência, amizade e compreensão.

Aos queridos amigos, Andréia P. Tassis, Amanda N. Figueiredo, Juliane Escoura, Helder M. Noccioli, Luana Piermann, Patrícia Guerra, Rafaela Roma, Larissa G. Silva, Carine R. Cardoso, Giovana Z. Vilela, Charlene Moura, Marina Fonseca, José Adinan Souza, Leandro Ueda, Rodolfo Pereira pela torcida e incentivo em todos os momentos.

Aos amigos da pós-graduação da Unesp, Eliana Scaloppi, Gabriella Cintra, André Fadel, Adriana Castro, Nélia Alves, Tia Silvia e Emílio, Bruno, Diego F. Fraga, Rafael Finholdt pelo auxílio e amizade.

Aos novos amigos professores do Instituto Federal Goiano, Anselmo Afonso Golynski, Kátia Roberta Fernandes, Amanda Golynski, Adelmo Golynski, Roberta Martins Rosa, Janete Golinski, Brenda Ventura, Rodrigo Silva, Karina Correa e Jesusney pela amizade, confiança e incentivo.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta conquista.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.	iii
ABSTRACT.	v
 CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.	 1
1. Introdução.	1
2. Revisão de literatura.	3
2.1. O comércio de plantas ornamentais.	3
2.2. A begônia e suas doenças.	5
2.3. O controle biológico.	10
3. Referências.	15
 CAPÍTULO 2 - CONTROLE BIOLÓGICO DO MOFO CINZENTO E DA MANCHA DE MIROTÉCIO EM BEGÔNIA.	 25
Resumo.	25
Abstract.	26
1. Introdução.	27
2. Material e métodos.	29
2.1. Obtenção dos isolados dos antagonistas e patógenos e sua preservação.	29
2.2. Avaliação da produção de metabólitos solúveis e voláteis e do hiperparasitismo de <i>Clonostachys rosea</i> e <i>Trichoderma asperellum</i> a <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Myrothecium roridum</i>	30
2.3. Antagonismo em discos de folhas de begônia de <i>Clonostachys</i> <i>rosea</i> e <i>Trichoderma asperellum</i> a <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Myrothecium</i> <i>roridum</i>	32
2.4. Controle biológico do mofo cinzento e da mancha de Mirotécio em cultivo comercial de begônias.	33
2.5. Análises estatísticas	34
3. Resultados.	34
3.1. Avaliação da produção de metabólitos solúveis e voláteis e do	

hiperparasitismo de <i>Clonostachys rosea</i> e <i>Trichoderma asperellum</i> a <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Myrothecium roridum</i>	34
3.2. Antagonismo em discos de folha de begônia de <i>Clonostachys rosea</i> e <i>Trichoderma asperellum</i> a <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Myrothecium roridum</i>	38
3.3 Controle biológico do mofo cinzento e da mancha de Mirotécio em cultivo comercial de begônias.	40
4. Discussão.	42
5. Referências.	48
CAPÍTULO 3 - PODRIDÃO DO COLO CAUSADA POR <i>Fusarium</i> sp. EM BEGÔNIA: ETIOLOGIA E CONTROLE BIOLÓGICO POR <i>Clonostachys rosea</i> LQC62 E <i>Trichoderma asperellum</i> LQC96.	54
Resumo.	54
Abstract.	55
1. Introdução.	56
2. Material e métodos.	57
2.1. Isolamento do agente causal da Podridão do colo da begônia e obtenção de isolados de fungos antagonistas.	57
2.2. Avaliação da produção de compostos solúveis pelos antagonistas. . .	58
2.3. Avaliação da produção de compostos voláteis pelos antagonistas. . .	59
2.4. Culturas pareadas.	60
2.5. Colonização dos antagonistas e supressão da esporulação do patógeno em hastes de begônia.	60
2.6. Controle biológico da podridão do colo por <i>Fusarium</i> sp. em cultivo comercial de begônias.	61
2.7. Análises estatísticas.	63
3. Resultados.	64
3.1. Obtenção e identificação do agente causal da podridão do colo da begônia.	64
3.2. Avaliação da produção de metabólitos solúveis e voláteis e do hiperparasitismo de <i>Clonostachys rosea</i> e <i>Trichoderma asperellum</i> a	

<i>Fusarium</i> sp.	65
3.3. Antagonismo em hastes de begônia de <i>Clonostachys rosea</i> e <i>Trichoderma asperellum</i> a <i>Fusarium</i> sp.	66
3.4. Controle biológico da podridão do colo causada por <i>Fusarium</i> sp. no cultivo comercial de begônias.	70
4. Discussão.	71
5. Referências.	76

CONTROLE BIOLÓGICO COMO COMPONENTE DO MANEJO INTEGRADO DE DOENÇAS FÚNGICAS EM BEGÔNIA

RESUMO – As espécies de *Trichoderma* spp. e *Clonostachys rosea* são bastante estudadas atualmente para o controle biológico de doenças de plantas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial dos antagonistas, *Trichoderma asperellum* (LQC96) e *Clonostachys rosea* (LQC62), no controle biológico das principais doenças fúngicas de begônia (mofo cinzento, mancha de Mirotécio e podridão do colo). A etiologia da podridão do colo em begônias foi estudada por meio das análises de suas características morfológicas e moleculares. Foram realizados ensaios *in vitro* a fim de verificar os mecanismos envolvidos no controle biológico dessas doenças, avaliados por meio da produção de compostos voláteis e compostos solúveis com ação inibitória aos patógenos, além da capacidade hiperparasítica dos antagonistas. A metodologia para avaliar os compostos voláteis consistiu em posicionar dois fundos de placas de Petri sobrepostas, contendo em uma delas cultura do antagonista e em outra, do patógeno. Para avaliar os compostos solúveis, foram utilizadas duas metodologias, o método em cultivo sobre o papel celofane para LQC96 e o método do filtrado da cultura líquida para LQC62. O hiperparasitismo foi avaliado por meio de culturas pareadas. Verificou-se a colonização e a supressão da esporulação em discos e em hastes de begônias. Após a análise do potencial *in vitro*, foram realizadas ensaios em casa de vegetação, a fim de verificar o controle dessas doenças em cultivo comercial de begônia. Nos ensaios *in vitro*, verificou-se que os antagonistas tiveram atividade antagônica contra esses patógenos, com a produção de compostos voláteis e solúveis, além de demonstrar a capacidade hiperparasítica de ambos antagonistas. Ambos agentes de controle biológico avaliados foram capazes de colonizar os discos e hastes de begônia e a aplicação preventiva na concentração de 1×10^7 conídios.ml⁻¹ demonstrou ser a mais efetiva na supressão da esporulação dos patógenos em discos e hastes de begônia. No ensaio em cultivo comercial houve redução da incidência das doenças com a aplicação semanal dos antagonistas. Para o controle do mofo cinzento e da mancha de Mirotécio as pulverizações foliares semanais de

LQC62 reduziram a incidência dessas doenças. Para o controle da podridão do colo em begônias, os tratamentos com LQC62 com aplicação foliar e no substrato apresentaram os melhores resultados seguidos dos tratamentos com LQC96, concluindo que ambos antagonistas foram eficientes no manejo da podridão do colo em begônia. Quanto à etiologia da podridão do colo descartou-se a associação da doença a *F. begoniae* devido a presença de clamidósporos. Com base na análise da região ITS, observou-se 99% de similaridade com isolados de *F. oxysporum*. Entretanto, na análise da região do fator de alongação 1-alfa, houve maior similaridade (100%) com isolados de *F. foetens*. Desta forma, com as análises efetuadas, não foi possível chegar a uma identificação precisa da espécie de *Fusarium* associada aos sintomas de podridão do colo. Sendo assim, estudos morfológicos e moleculares complementares são necessários para a identificação desta espécie.

Palavras-chave: *Begonia elatior*, *Botrytis cinerea*, *Clonostachys rosea*, Floricultura, *Fusarium* sp., *Myrothecium roridum*, *Trichoderma asperellum*.

BIOLOGICAL CONTROL AS A COMPONENT OF INTEGRATED MANAGEMENT OF FUNGAL DISEASES IN BEGONIA

ABSTRACT – Currently the species of *Trichoderma* spp. and *Clonostachys rosea* are widely studied for biological control of plant diseases. The aim of this study was to evaluate the potential of these isolates these antagonists (*T. asperellum* LQC96 and *C. rosea* LQC62) in the biological control of major fungal diseases of begonia (gray mold, *Myrothecium* leaf spot and stem rot). The etiology of stem rot was studied using morphological and molecular analysis. *In vitro* assays were performed to verify the mechanisms involved in the biological control of these diseases, measured by the production of volatile and soluble compounds with an inhibitory effect on pathogens and the ability of antagonist hyperparasitism. The methodology for assessing the volatiles consisted of placing two Petri dishes superimposed on one culture containing the antagonist and another pathogen. To evaluate soluble compounds, two methods were used, the cultivation on cellophane for LQC96 and the culture liquid filtrate method for LQC62. The hyperparasitism was assessed using paired cultures. There colonization and suppression of sporulation was evaluate on leaf disks and stem of begonias. After analysis of the potential *in vitro* assays, were performed in a greenhouse in order to verify the control of these diseases in commercial cultivation of begonia. *In vitro* assays was found that the antagonists were antagonistic activity against these pathogens, producing volatile and soluble compounds, and demonstrate the ability of hyperparasitism. Both biocontrol agents evaluated were able to colonize the leaf discs and stem of begonia and preventive application in concentration of 1×10^7 conidia mL⁻¹ proved to be the most effective in suppressing pathogen sporulation on leaf discs and stem of begonia. The essay on commercial cultivation decreased the incidence of diseases with weekly application of antagonists. For control of gray mold and *Myrothecium* leaf spot, the foliar sprays weekly LQC62 reduced the incidence of these diseases. For control of stem rot, treatments with LQC62 with foliar application and soil application showed the best results followed by treatment with LQC96, concluding that both antagonists were effective in the management of stem rot in begonia. The etiology of

stem rot caused by *Fusarium* sp. on begonias demonstrate that the morphological features discarded *F. begoniae*, due to the presence of chlamydospores. Based on the analysis of the ITS region, there was 99% similarity with isolates of *F. oxysporum*. However, the analysis of the region of elongation factor 1-alpha, a greater similarity (100%) with isolates of *F. foetens*. Thus, with the analyzes performed, it was not possible to reach a precise identification of the species of *Fusarium* associated with symptoms of stem rot. Therefore, morphological and molecular studies are needed to confirm this species.

Keywords: *Begonia elatior*, *Botrytis cinerea*, *Clonostachys rosea*, Floriculture, *Fusarium* sp., *Myrothecium roridum*, *Trichoderma asperellum*.

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

As cultivares de *Begonia* x *elatio*r são plantas provenientes do cruzamento de *B. socotrana* Hook. x *B. tuberhybrida* Voss, estão entre as dez flores mais vendidas na Europa Ocidental (REYNOLDS et al., 1998) e no Brasil (JUNQUEIRA; PEETZ, 2008). Isso ocorre em função de plantas deste gênero apresentam grande diversidade de cores das inflorescências, bem como em função da resposta ao fotoperíodo e da longevidade das inflorescências (LARSON, 1980; REYNOLDS et al., 1998).

Na cultura da begônia, incidem doenças ocasionadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides, que demandam um manejo eficiente para evitar danos econômicos e sua depreciação (ALEXANDRE; DUARTE, 1995). Dentre as doenças, destacam-se o mofo cinzento (*Botrytis cinerea*), mancha de Mirotécio (*Myrothecium roridum*), fusarioses (*Fusarium* spp.), podridão da haste (*Lasiodiplodia theobromae*) e mancha bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*) (ALEXANDRE; DUARTE, 1995; DAUGHTREY et al., 1995; SCHROERS et al., 2004; FUJINAWA et al., 2012a).

Não existe nenhuma medida de controle que seja eficiente de forma isolada, seja comercialmente efetiva e que proporcione proteção das plantas por longo prazo. Não se tem observado resistência das variedades de *B. elatio*r a essas doenças. Algumas medidas de controle são adotadas para minimizar as perdas, tais como a limpeza de mesas, bancadas, ferramentas e maquinários, rouging, eliminação e destruição de restos culturais, obtenção de mudas sadias, manejo do ambiente e obtenção de substrato livre do patógeno e de boa drenagem (JARVIS, 1989; JARVIS, 1992; ALEXANDRE; DUARTE, 1995; DAUGHTREY et al., 1995; HAUSBECK; MOORMAN, 1996; O'NEILL et al., 2000; GULLINO; GARIBALDI, 2007).

O controle biológico tem sido uma alternativa estudada para o manejo de doenças em plantas ornamentais (SUTTON et al., 1997; KÖHL et al., 1998; TATAGIBA, et al., 1998; MCQUILKEN et al., 2001; PAULITZ; BÉLANGER, 2001; MORANDI et al., 2003, MORANDI et al. 2006 SILVERA-PÉREZ et al., 2010). Um agente de controle biológico bastante estudado é o fungo *Clonostachys rosea*, anteriormente classificado como *Gliocladium roseum* (SAMUELS, 1976; SCHROERS et al., 1999).

Os primeiros trabalhos com *C. rosea* iniciados no final da década de 1980, mostraram que este antagonista é capaz de suprimir a esporulação de *B. cinerea* em folhas, pétalas e estames de morangueiro, com eficácia igual ou superior a captan, fungicida padrão no controle da doença (PENG; SUTTON, 1991). Deste então, este fungo tem sido testado no controle de *B. cinerea* em outros hospedeiros, em ornamentais como gerânio, begônia, ciclâmen, rosa e fúcsia (SUTTON et al., 1997; TATAGIBA, et al., 1998; KÖHL et al., 1998; MORANDI et al., 2003, MORANDI et al., 2006; SILVERA-PÉREZ et al., 2010). *Clonostachys rosea* reduz o desenvolvimento e esporulação de *B. cinerea* por competição por nutrientes, hiperparasitismo, competição por nutrientes e por colonização de tecidos senescentes e tecidos mortos (LUMSDEN, 1981; SUTTON et al., 1997; YU; SUTTON, 1997a; KÖHL; FOKKEMA, 1998; MORANDI et al., 2001).

Da mesma forma, *Trichoderma* spp. têm sido amplamente utilizado como agentes de controle biológico, tanto no controle de patógenos foliares, quanto para patógenos do solo (ANDREWS, 1992; ELAD, 2000; PAULITZ, 2000; PAULITZ; BÉLANGER, 2001). O isolado de *T. harzianum* T39 foi primeiramente desenvolvido para o controle do mofo cinzento na cultura da uva, e atualmente é um dos agentes de biocontrole mais utilizado para o biocontrole do mofo cinzento em casa de vegetação em várias culturas (MALATHRAKIS; KLIRONOMOU, 1992; ELAD; SHTIENBERG, 1995; ELAD; SHTIENBERG 1996; ELAD et al., 1996; HJELJORD, et al., 2000).

Esse trabalho teve como objetivos: i) Avaliar os mecanismos de ação dos antagonistas, *T. asperellum* LQC96 e *C. rosea* LQC62, no controle biológico do mofo cinzento, da mancha de Mirotecio e podridão do colo; ii) Avaliar a colonização de LQC96 e LQC62 em discos de folha ou haste de begônia, bem como a supressão da esporulação de *B. cinerea*, *M. roridum* e *Fusarium* sp.; iii) verificar o potencial de biocontrole dos antagonistas, LQC96 e LQC62, as doenças fungicas de begônia em condições comerciais de cultivo e, por fim iv) Verificar a etiologia de *Fusarium* sp., agente causal da podridão do colo em begônias.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O comércio de plantas ornamentais

No Brasil, o cultivo e a comercialização de plantas ornamentais tornou-se uma atividade expressiva a partir da década de 70, iniciados principalmente pelos imigrantes europeus e asiáticos. E em consequência, esta atividade passou a apresentar os primeiros sinais de organização e crescimento nos estados de São Paulo e Minas Gerais (JUNQUEIRA; PEETZ, 2008; SÃO JOSÉ, 2005).

A produção de plantas ornamentais apresenta um fluxo no comércio internacional na ordem de U\$ 60 bilhões por ano, ocupando uma área cultivada mundial de aproximadamente 190 mil hectares (MOTOS, 2000). Em 2007, o Brasil exportou U\$ 35,28 milhões, resultado 9,18% maior quando comparado com o obtido no ano anterior (JUNQUEIRA; PETTZ, 2008). Porém em 2010, as exportações foram de U\$ 28,8 milhões, segundo SECEX, tendo uma redução de 8,8% em relação a 2009. Em 2012, o volume foi de 26,1 milhões, sendo esperadas mais reduções em 2013 (BITTENCOURT, 2013). No cenário mundial, o mercado de flores está concentrado na União Européia, Estados Unidos e Japão. Destacam-se, ainda, a Colômbia, o Equador e a Costa Rica na América Latina, e a China, na Ásia (MOTOS; PACHECO, 2004).

Apesar das características do mercado externo, o principal mercado da floricultura brasileira é o interno, que em 2007 atingiu 1,3 bilhões de dólares e, apesar de exportar para mais de 40 países, esta exportação representou somente 0,22% do mercado internacional e 3% da produção nacional (BUAINAN; BATALHA, 2007). O mercado interno brasileiro demonstra ritmo de crescimento em 2012 e 2013 devido a descentralização do comércio de flores somente nas datas especiais, como Dia das Mães e Dia dos Namorados vindo da mudança de hábitos dos brasileiros, além do investimento da construção civil em áreas verdes (GARCIA, 2013, BITTENCOURT, 2013).

O consumo brasileiro gira em torno de US\$ 4,70 per capita. Entretanto, no período de 1994 a 1998, esse atingiu US\$ 6,00 per capita. Contudo, tais números são, ainda, muito baixos frente a padrões mundiais. Na Suíça e na Noruega, por exemplo, o

consumo per capita chega a US\$ 170,00 e US\$ 143, 00, respectivamente. Na Alemanha, US\$ 137, 00, nos EUA, US\$ 36,00 e na Argentina, US\$ 25,00. As estimativas indicam que o consumo potencial é, pelo menos, equivalente ao dobro do atual, se superadas as restrições geradas por aspectos econômicos e culturais, entre os quais o da concentração da demanda apenas em datas festivas e comemorativas, como o Dia das Mães, dos Namorados, Finados, entre outros (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FLORES, 2007).

No Brasil, a área cultivada é de aproximadamente 9 mil hectares, destacando-se as regiões Sul e Sudeste, as quais representam 70% da produção nacional de flores e plantas ornamentais. A região sudeste se destaca por possuir a maior área cultivada, aproximadamente 5,5 mil hectares, e o maior volume de produção (AKI; PEROSA, 2002; KIYUNA et al., 2013; SÃO JOSÉ, 2005; BRAINER; OLIVEIRA, 2007, IBRAFLO 2012). Apesar de ainda estar concentrado no Estado de São Paulo, particularmente nas regiões dos municípios de Holambra, Atibaia, via Dutra e Ibiúna, a floricultura brasileira evidencia fortes tendências de descentralização produtiva e comercial para várias regiões de todo o país. Estima-se que existam cerca de 5 mil produtores de flores no Brasil, na categoria de pequenos e médios empresários, possuindo em média 1,8 hectares/produtor e gerando 3,8 empregos/hectare, movimentando em torno de 20 milhões (JUNQUEIRA; PEETZ, 2007; BRAINER; OLIVEIRA, 2007).

A rentabilidade média anual, em 1995, de uma área de um hectare de flores variava entre U\$ 90 mil e U\$ 150 mil, ao passo que, se neste mesmo hectare fosse desenvolvida a atividade da fruticultura, a rentabilidade variava entre US\$ 30 mil e US\$ 90 mil. Assim, Claro (1998) relatou ser possível arriscar a afirmativa de que a floricultura se constitui na forma mais adiantada de evolução agrícola, pois se utiliza de elevado grau de tecnologia, além de ser altamente competitiva.

IBGE (2002) descreve com relação ao controle de pragas e doenças, 81,94% dos estabelecimentos com atividade principal "produção de flores e plantas ornamentais" fizeram controle. Dos 81,94% que fazem controle, 91,60% o aplicaram em plantas ornamentais. Estes produtores apresentaram receita 30,84% maior em flores e plantas ornamentais, em média, do que aqueles que não fizeram controle. É uma proporção aparentemente alta, mas poderia ser maior em função da necessidade de se evitar organismos deletérios aos vegetais, com fins de ornamentação. É extremamente

negativa, do ponto de vista econômico, a ocorrência de manchas ou outras alterações nos padrões desejáveis de qualidade, pois reduzem o valor da espécie explorada ou, até mesmo, impedem a sua comercialização. Contudo, o que deve ser enfatizado neste campo é o uso adequado de agrotóxicos, buscando a sua maior eficiência e segurança, bem como manejos alternativos para os problemas fitossanitários.

Estudos sobre a eficiência dos agrotóxicos e boas práticas agrícolas são de fundamental importância para que no Brasil não aconteça o que ocorreu na Holanda, onde Griffin (1995) informou que, na década de 1970, a contaminação ambiental devido ao uso de agrotóxicos na floricultura era tão alta, que os holandeses tiveram que parar de consumir água de seus rios, abastecendo-se das águas purificadas do rio Reno.

O incremento da produção de flores e plantas ornamentais é uma realidade em diversos países. O crescimento deste segmento no Brasil está ligado aos altos investimentos em tecnologia, grande diversidade e amplitude de climas e solos, além do cultivo em ambiente protegido, viabilidade de cultivo de diversas plantas ornamentais (nativas e exóticas) e a grande capacidade de gerar empregos diretos e indiretos (ANEFALOS; GUINHOTO, 2003). Esses fatores são determinantes diretos da qualidade do produto, ao mesmo tempo em que permitem sensíveis ganhos competitivos via preço no mercado externo. Por outro lado, ainda existe um longo caminho a trilhar no que tange aos procedimentos de comercialização, desenvolvimento de novos nichos de mercado e criação de programas de estímulo à demanda doméstica. Segundo Mager (1995), a floricultura é uma atividade que deve ser incentivada, pois além de proporcionar altos rendimentos, necessita de muita mão-de-obra e tecnologia.

2.2. A begônia e suas doenças

As begônias são do gênero *Begonia* pertencem à família das Begoniaceas, com aproximadamente 1200 espécies diferentes, existindo diversos híbridos comerciais, são considerados um gênero muito popular de plantas de vaso (ROCKFORD; GORER, 1974). Consistem de plantas com diversos tamanhos, diferentes habitats, folhagens e flores, mas apresentam características em comuns: apresentam flores femininas e masculinas separadas em uma mesma planta, a flor feminina possui ovário inferior tri-aladas, e as flores comumente agrupadas, com brácteas na base da flor ou no caule;

folhas alternadas, obliquamente ovais, com duas estípulas na base (BRILMAYER, 1963). Elas podem ser classificadas pelo seu sistema radicular em fibrosas, tuberosas e rizomatosas (SEABROOK; ROCHFORD, 1974; MEJIAS; RUANO, 1990). Segundo Brilmayer (1963), as begônias possuem origem tropical e as primeiras espécies foram descobertas em Santo Domingo em 1690 por Charles Plumier, na qual as nomeou em homenagem a Michel Begon. Na região dos Andes, foi descoberta a primeira begônia tuberosa, a qual é considerada a ancestral de todas as begônias híbridas tuberosas atualmente comercializadas. Da África, surgiram as begônias semi-tuberosas “Maple”, do Brasil as *B. semperflorens*, e do México as espécies rizomatosas. Atualmente estão sendo descobertas novas espécies (YE et al., 2004; PENG; LIU; KU 2005; THOMAS; HUGHES, 2008).

A begônia (*Begonia x elatior* Hort. ex Steud) é conhecida comumente como begônia de flor e está entre as principais plantas ornamentais produzidas e comercializadas no país, sendo amplamente utilizadas principalmente na decoração de interiores (REYNOLDS et al., 1998; JUNQUEIRA; PEETZ, 2008). As *Begonia x elatior* são grupo de cultivares híbridas derivadas do cruzamento entre a *B. socotrana* Hook proveniente do sudeste da Arábia e de muitas espécies de begônias tuberosas (complexo de *B. x tuberhybrida*) do Peru e da Bolívia (KARLSSON; HEINS, 1992). No Brasil, o cultivo de *B. x elatior* teve início no final da década 80 no estado de São Paulo pela importação de variedades oriundas da Europa. A comercialização ocorre durante todo o ano com picos em determinadas épocas, como Dia Internacional da Mulher, Dia das Mães, Dia dos Namorados, Natal e Ano Novo. Comercializado principalmente em CEASAs, como Entrepasto Atacadista da CEAGESP (São Paulo), Mercado Permanente de Flores da CEASA Campinas e em outros importantes centros de vendas, como Veiling Holambra e SP flores.

No Brasil, o estado de São Paulo destaca-se com o cultivo das variedades de *B.x elatior*, sendo estas cultivadas sob casas de vegetação, em vasos pote 11 e pote 15. O ciclo da cultura é de aproximadamente 14 semanas e 19 semanas para pote 11 e pote 15, respectivamente. Existem cerca de 30 variedades, nas cores amarelo, laranja, rosa, branco, vermelho e cores mistas. A propagação é realizada por estaqueamento de folhas, cultivadas em substratos comerciais, que geralmente contém turfa, casca de pinus, casca de arroz carbonizado, fibra de coco e vermiculita expandida, mantidas sob

alta umidade. A indução do florescimento ocorre no comprimento do dia de 12 e 14 horas, sendo assim, o produtor realiza o planejamento da produção conforme o manejo do fotoperíodo. As begônias são plantas de interiores, devem ser mantidas em meia sombra, sem sol direto e de preferência em locais quentes e úmidos.

As plantas ornamentais, incluindo as begônias, são suscetíveis a um grande número de doenças que podem constituir um dos fatores limitantes à sua produção. As doenças mais comuns em begônias são o mofo cinzento (*Botrytis cinerea*), oídios (*Oidium begoniae*), alternarias (*Alternaria* sp.), fusarioses (*Fusarium begoniae* e *F. foetens*), mancha bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*), murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) cercosporiose (*Cercospora begoniae*), mancha de mirotécio (*Myrothecium roridum*), antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), podridões de folhas e hastes (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Lasiodiplodia theobromae* e *Pythium* sp.) e nematóide das folhas (*Aphelenchoides fragariae*) (ALEXANDRE; DUARTE, 1995, DAUGHTREY et al., 1995, SCHROERS et al., 2004; FUJINAWA et al., 2012^a; FUJINAWA et al., 2012b). Essas doenças podem ser fatores limitantes na sua produção afetando a qualidade, durabilidade e produção de begônias.

No caso do mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea* Pers.: Fr., cuja forma perfeita é o ascomycota *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel, é um fungo necrotrófico, não especializado, encontrado em todo o mundo, o qual esporula em tecidos mortos ou em restos de culturas encontrados na superfície do solo e que causa severas perdas em diversas culturas (LI et al., 2002; JARVIS, 1992). As infestações em begônias ocorrem quando a umidade está elevada (>90 %) com temperaturas entre 20-24 °C. A rápida mudança da umidade relativa estimula a produção de esporos, principalmente nas horas mais quentes do dia. A alta densidade de plantas e baixa circulação do ar podem favorecer o aumento da incidência desta doença. Os conídios são dispersos pelo vento, gotas de água ou movimento de trabalhadores efetuando práticas culturais (JARVIS, 1980; JARVIS, 1989; HAUSBECK ;PENNYPACKER, 1991).

O patógeno ataca todos os órgãos de parte aérea, principalmente na fase final de cultivo. Nas folhas, os sintomas iniciais são lesões encharcadas e posteriormente torna-se de coloração castanho claro, apresentando halos concêntricos acompanhado de abundante esporulação de aspecto cotonoso de coloração cinza (conídios e condióforos). Nas flores, os sintomas podem variar desde pequenas manchas

descoloridas e úmidas, os quais, com o progresso da doença, evoluem para lesões necróticas com a completa destruição das flores. Pode afetar o estágio inicial, quando afeta as mudas, ocasionando podridões na base da estaca foliar. Para o manejo desta doença são adotadas medidas culturais, como eliminação diária de restos culturais e plantas infectadas, manutenção de um espaçamento adequado entre plantas adequado para permitir a circulação de ar, manejo do ambiente (temperatura e umidade), sanitização, irrigação na altura do substrato para evitar o molhamento foliar, devendo ser realizada durante as primeiras horas do dia para que as folhas sequem, mantendo-se mais secas possíveis e adubação adequada (JARVIS, 1989; JARVIS, 1992; DAUGHTREY et al., 1995; HAUSBECK; MOORMAN, 1996).

A aplicação de fungicidas é realizada quando há condições propícias para o aparecimento do mofo cinzento, sendo registrados produtos a base de tiofanato-metílico e clorotalonil, (AGROFIT, 2012). Porém, já tem relatos da resistência a fungicidas observadas em isolados de *B. cinerea* (PAK et al., 1990; JOHNSON et al., 1994; LAMONDIA E DOUGLAS, 1997; YOURMAN E JEFFERS, 1999; DIANEZ et al., 2002; MYRESIOTIS et al., 2007), aspectos esses derivadas da sua grande maleabilidade genética (KIMATI, 1995).

A mancha de mirotécio em begônias foi recentemente descrita no Brasil por Fujinawa et al. (2012b), e tem como agente causal o fungo *Myrothecium roridum* Tode: Fr, o qual também possui uma ampla gama de hospedeiros, incluindo ornamentais como gardênia, gloxínia, maria-sem-vergonha, sálvia, vrisea, lírio da paz, tango, antúrio e comigo-ninguém-pode (CHASE, 1992; TSAY et al., 1999; MANGANDI et al., 2007; QUEZADO-DUVAL et al., 2010).

Myrothecium roridum é considerado um fungo parasita facultativo, sobrevivendo a maior parte como saprófita no solo, sendo patogênico na presença de um hospedeiro suscetível e em condições favoráveis. Os sintomas em begônias são manchas foliares inicialmente pequenas e circulares evoluindo para irregulares, de coloração castanho claro onde podem ser observadas a presença de esporodóquios de coloração verde-escuro com formatos irregulares, com franja esbranquiçada formada pelo micélio. Os esporodóquios são formados em anéis concêntricos dentro das áreas de necrose (DAUGHTREY et al., 1995; FUJINAWA et al., 2012b).

Em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar), *M. roridum* forma colônias de coloração

branca com verso de coloração amarelada, com o decorrer do tempo as colônias apresentam círculos concêntricos formados pelos esporodóquios, com formatos irregulares e uma franja branca de micélio. Este fungo forma esporodóquios com 190-290 µm de diâmetro. Os conídios são hialinos, unicelulares, elipsóides ou em forma de bastão com ambas as extremidades arredondadas e gutulados, medindo 5-7,5 x 2 µm (FUJINAWA et al., 2012b). Ainda não existem produtos registrados para o controle desta doença em begônias (AGROFIT, 2012;).

Entre os fitopatógenos mais agressivos na cultura de begônia, a fusariose tem grande importância para a cultura por acarretar perdas elevadas e ser de difícil controle. As espécies de *Fusarium* possuem um estágio saprofítico, são amplamente distribuídos no solo e causam uma enorme variedade de doenças em uma ampla gama de plantas hospedeiras. Persistem quase que indefinidamente na forma de micélio em restos culturais ou como esporos de resistência denominados clamidósporos. Estes, por sua vez, podem permanecer viável por mais de 20 anos (PFENNING; LIMA, 2012). A maioria das espécies produz tanto microconídios como macroconídios (ALEXOPOULOS et al., 1996). A dispersão deste patógeno ocorre pela água, pelo solo, material propagativo infectado, instrumentos e maquinários contaminados e a sua penetração na planta ocorre de maneira direta ou por ferimento. A taxonomia de *Fusarium* sofre constantes mudanças em função dos conceitos de espécie utilizadas.

As espécies *F. begoniae* (Nirenberg and O'Donnell) [sin. = *Fusarium sacchari* (Butler) W. Gams var. *elongatum*] e *F. foetens* são conhecidas como patógenos de begônia (CAVAT, 1993; NIRENBERG; O'DONNELL, 1998; SCHROERS et al., 2004).

Fusarium foetens foi relatado na Holanda em 2000 (SCHROERS et al., 2004), no Alemanha em 2001 (EPPO REPORTING SERVICE, 2005), no Reino Unido em 2002 (JONES, 2002), nos EUA em 2003 e 2004 (ELMER et al., 2004), no Japão em 2005 (SEKINE et al., 2008, TIMOTE et al., 2009) e recentemente na França (SAURAT et al., 2013). As plantas doentes mostram uma combinação da podridão basal, amarelecimento dos feixes vasculares e murchas (SCHROERS et al., 2003; ELMER; VOSSBRINCK, 2004; BRAND; WIENBERG, 2005; ELMER et al., 2008). Verifica-se a presença de uma grande massa de macroconídios na base das plantas colapsadas. Ainda não há relatos deste fungo associado a begônias no Brasil.

Estudos preliminares têm mostrado que *F. foetens* não é um agente patogênico

de plantas ornamentais, tais como em *Saintpaulia ionantha*, híbridos de *Impatiens* e *Euphorbia pulcherrima*. Quando inoculadas, as plantas *Cyclamen persicum* não desenvolvem a doença, mas apresenta vasos descoloridos a partir do qual o fungo pode ser re-isolados. As plantas doentes mostraram uma combinação da podridão basal, amarelecimento dos feixes vasculares e murcha, em cuja base apresenta-se colapsada e coberto por uma grande massa de macroconídios *Fusarium* (SCHROERS et al., 2004).

Fusarium begoniae ocasiona queima em flores, folhas e haste (DE GRUYTER et al., 1994) listras transversais marrons necróticas sobre as veias, caules e folhas e flores (BLIND et al., 1995) e causa podridão seca e cancro em hastes de begônias, não está associada com danos nas raízes ou causando descoloração vascular (ELMER et al., 2004) . Porém, não existem estudos ou relatos destas espécies no Brasil.

Fusarium oxysporum pertence à divisão de fungos mitospóricos (imperfeitos), classe Hyphomycetes e ordem Tuberculariales (ALEXOPOULOS, et al., 1996) O controle deste fungo é bastante difícil. Atualmente, não existe fungicida registrado no Brasil para o seu controle e há uma carência de informações sobre cultivares resistente. Muitos agricultores fumigavam o substrato e/ou solo com brometo de metila visando seu controle. Porém, devido ao seu impacto ambiental (destruição da camada de ozônio) e na saúde pública (cancerígeno), sua comercialização está proibida desde 2007 no Brasil. Além disso, o uso de brometo de metila não controla a infecção por *Fusarium* que ocorre após a sua aplicação e, muitas vezes, pode aumentar a sua incidência devido à formação de vácuo biológico. Logo, as medidas de controle preventivas são as mais recomendadas, como: drenagem do terreno, eliminação de plantas doentes, limpeza do terreno, aquisição de mudas saudáveis, plantio em aéreas com baixa densidade do patógeno, substrato supressivo e uso de antagonistas entre outras. Em áreas com o patógeno, uma provável alternativa para o seu controle é a associação entre as medidas de limpeza do ambiente com o uso de antagonistas (DAUGHTREY et al., 1995; O'NEILL et al., 2000; GULLINO E GARIBALDI, 2007; ELMER, 2008).

2.3. O controle biológico

Os problemas ocasionados pelo uso de agrotóxicos e as exigências do mercado por produtos mais saudáveis, livres de agrotóxicos e de produção mais sustentável,

estão ocasionando mudanças no manejo de pragas e doenças. Uma das ferramentas quem vem se destacando é o controle biológico (MORANDI; BETTIOL, 2008). O controle biológico tem algumas vantagens sobre o controle químico, como ausência de resíduos químicos em alimentos e no ambiente, não exposição de trabalhadores a agrotóxicos e menores riscos de desenvolvimento de resistência dos patógenos aos produtos químicos.

Segundo Cook e Baker (1983), definem o controle biológico de doenças como sendo a ação de um ou mais organismos que não o homem, na redução da soma de inóculo ou das atividades que acarretam a doença provocada por um patógeno. Outro conceito também abordado “controle biológico é a redução da intensidade de inóculo ou das atividades de um patógeno que determinam uma doença, realizada direta ou indiretamente por um ou mais organismos” (COOK; BAKER, 1983). Sendo assim, o controle biológico é o resultado de uma interação entre o hospedeiro, patógeno e uma variedade de não patógenos que também interagem direta ou indiretamente na infecção e que apresentam potencial para limitar a atividade do patógeno ou induzir a resistência do hospedeiro.

Os agentes de biocontrole podem atuar por meio de vários mecanismos de ação. Os mecanismos de antagonismos mais estudados são: antibiose, parasitismo, predação, competição, hipovirulência, indução de defesa da planta e alelopatia (BETTIOL; GHINI, 1995).

O controle biológico de doenças no Brasil é um fenômeno recente e de progresso lento. Um dos primeiros trabalhos foi realizado pelo pesquisador Reinaldo Foster, publicado em 1950, o qual utilizou filtrado de *Trichoderma* para a inativação do vírus do mosaico do fumo (FOSTER, 1950). Após 37 anos, pesquisadora da Embrapa Dra. Rosa Maria Valdebenito-Sanhueza disponibilizou o primeiro produto comercial a base de *Trichoderma viride* para o controle de *Phytophthora cactorum* em macieira (VALDEBENITO-SANHUEZA, 1991). Em 1990 Shinobu Sudo desenvolveu o produto a base de *Acremonium* sp. para o controle da lixa do coqueiro. CEPEC/CEPLAC desenvolveu Tricovab® (*Trichoderma stromaticum*) para o controle da vassoura de bruxa do cacaueiro. Ocorreram concomitantemente com o desenvolvimento de bioprodutos, várias reuniões, publicações, trabalhos e disciplinas sobre controle biológico de doenças no Brasil.

Dentre os produtos biológicos existentes no Brasil, destacam-se: estipes fracas de CTV utilizados na premunização contra o vírus da tristeza dos citros (COSTA; MÜLLER, 1980 MÜLLER; COSTA, 1987); *Dicyma pulvinata* (Berk & M.A. Curtis) Arx (syn. *Hansfordia pulvinata*) para o controle de mal das folhas da seringueira (JUNQUEIRA; GASPAROTO 1991); *Acremonium* sp. para o controle da lixa do coqueiro (SUDO, 1989); *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. para o controle de diversas doenças de solo e substrato e da parte aérea.

Outro exemplo de agente de biocontrole de doenças é o fungo *Lecanicillium lecanii* (sin. *Verticillium lecanii*, *Verticillium hemileiae*) que apresenta ação entomopatogênica e micoparasítica nas pústulas de ferrugem em folhas do cafeeiro (SHAW, 1988; CARRION; RICO-GRAY, 2002; JACKSON et al. 2012), também são conhecidos como agente de biocontrole para outros fitopatógenos, insetos e nematóides, evidenciando o seu potencial como agente de biocontrole (VERHAAR et al. 1997; BENHAMOU, 2004; GOETTEL, 2008).

O controle biológico de um patógeno do filopiano é geralmente feito pela introdução e estabelecimento de antagonistas do filopiano. O antagonista aplicado deve multiplicar-se e colonizar o filopiano para que seja bem sucedido, exercendo competição e ou antibiose com o patógeno pelo sítio de infecção colonizando o filopiano antes da sua instalação, reduzir a colonização, esporulação e a formação de estruturas de sobrevivência bem como inibir a disseminação do patógeno (FOKKEMA, 1993). Para os patógenos foliares os agentes de biocontrole mais utilizados são *Bacillus subtilis* e *Clonostachys rosea* e destacam-se as espécies de *Trichoderma* spp. para o controle de patógenos habitante do solo e substrato, tais como *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Sclerotinia*, *Macrophomina*, *Botrytis* e *Crinipellis* em diversas culturas (MORANDI; BETTIOL, 2009; BETTIOL et al., 2012).

O controle biológico de doenças de plantas é considerado promissor principalmente em cultivo protegido, pois, as mesmas condições que favorecem a ocorrência de doenças favorecem o estabelecimento e ação dos agentes de controle biológico, sendo que neste ambiente é possível manejar a umidade relativa, a temperatura e a radiação colaborando com a eficiência e a sobrevivência dos bioagentes. As culturas de ambiente protegido normalmente são de alto valor e geralmente o numero de fungicidas registrados para essas culturas é limitado,

demonstrando assim o potencial da aplicação de agentes de biocontrole (PAULITZ; BÉLANGER, 2001). No Brasil, o cultivo protegido cresce continuamente, principalmente, com plantas ornamentais, hortaliças e frutas, tornando atrativo para o biocontrole de doenças.

O fungo filamentoso *Clonostachys rosea*, anteriormente classificado como *Gliocladium roseum*, sendo teleomorfo de *Bionectria ochroleuca* (SCHROERS et al., 1999) tem emergido como um eficaz e versátil agente de controle biológico (SUTTON et al., 1997). Os trabalhos utilizando *C. rosea* como agente de biocontrole surgiram no final da década de 1980 para o controle do mofo cinzento do morangueiro realizados pelos pesquisadores canadenses (PENG; SUTTON, 1990), a partir destes trabalhos, vem despertando interesse em outros países onde este antagonista também ocorre, entre eles o Brasil (NOBRE et al., 2005; SURGEONEVER, 1998).

Clonostachys rosea pode atuar por meio de diversos mecanismos de ação contra uma diversidade de fitopatógenos, incluindo: competição de nutrientes e/ou substrato e espaço, principalmente na competição na colonização de tecidos senescentes e tecidos mortos (SUTTON; PENG, 1993; SUTTON et al., 1997; YU; SUTTON, 1997b; KÖHL; FOKKEMA, 1998; MORANDI et al., 2000, MORANDI et al., 2001); micoparasitismo de hifas (YU E SUTTON, 1997b, SUTTON et al., 1997; XUÉ, 2003) e estruturas de resistência; antibiose (DEACON E BERRY, 1992; PACHENARI E DIX, 1980) indução de resistência do hospedeiro (LAHOZ et al., 2004; SUTTON et al., 1997). Este antagonista tem a capacidade de suprimir a esporulação e a infecção do patógeno além da sua provável capacidade de se estabelecer endofiticamente em tecidos verdes (SUTTON et al., 1997; YU E SUTTON, 1997b; KÖHL E FOKKEMA, 1998; MORANDI et al., 2001).

O principal patossistema estudado é o biocontrole de *C. rosea* é contra o mofo cinzento, em diversas culturas, dentre as plantas ornamentais destacam-se a roseira (*Rosa hybrida*), begônia (*Begonia* sp.), ciclâmen (*Cyclamen persicum*), gerânio (*Pelargonium* sp.), gérbera (*Gerbera* sp.), hortênsia (*Hydrangea macrophylla*), violeta persa (*Exacum affine*), e fúcsia (*Fuchsia speciosa*) (LI et al., 1995; SUTTON et al., 1997; KÖHL et al., 1998; TATAGIBA et al., 1998; MORANDI et al., 2003; MORANDI et al., 2002; MORANDI et al., 2001; MORANDI et al., 2006; SILVERA-PÉREZ et al., 2010).

Trichoderma spp. são fungos saprófitos, cujo teleomorfo, corresponde ao gênero *Hypocrea* amplamente utilizado como agentes de biocontrole e na indústria pela

produção de enzimas, tais como quitinase e a celulase (MELO, 1991; HARMAN; KUBICEK, 1998). É um fungo natural do solo encontrado principalmente em solos orgânicos, sobrevivendo saprofiticamente ou parasitando outros fungos. *Trichoderma* spp. tem sido utilizado como agente de biocontrole contra uma gama de patógenos foliares e quanto para patógenos do solo causadores de doenças em várias culturas (SIVAN; CHET, 1989; ANDREWS, 1992; ELAD, 2000; PAULITZ, 2000; PAULITZ; BÉLANGER, 2001; HOWELL, 2003; HARMAN, et al., 2004; BETTIOL, 2011).

O isolado de *T. harzianum* T39 foi primeiramente desenvolvido para o controle do mofo cinzento na cultura da uva, e atualmente é um dos agentes de controle biológico mais utilizado para o biocontrole do mofo cinzento em casa de vegetação (MALATHRAKIS; KLIRONOMOU, 1992; ELAD; SHTIENBERG, 1995; ELAD et al., 1996; Elad; Shtienberg, 1996; Hjeljord, et al., 2000;) e age na prevenção da infecção, inibindo a germinação dos esporos do *B. cinerea*, além de prevenir a penetração do patógeno, inibindo o seu processo de degradação dos tecidos vegetais (ZIMAND et al., 1996).

A atividade de biocontrole tem sido intensamente estudada e deve-se, sobretudo a produção de enzimas líticas extracelulares degradadoras da parede celular de muitos fungos, tais como celulases, quitinases, β -1-D-glucanases, β -1,4-glucosidases e proteases (CORABI-ADELL et al., 2002). Alguns isolados podem produzir mais de 100 diferentes tipos de metabolitos conhecidos com ação antibiótica (HUTCHINSON; COWAN, 1972; SIVASITHAMPARAM; GHISALBERTI, 1998,) além da habilidade de colonizar e crescer em associação com raízes de plantas, denominada competência da rizosfera -“rhizosphere competence”, conferindo uma vantagem competitiva com relação aos patógenos (HARMAN E KUBICEK, 1998; KUBICEK; HARMAN, 1998).

Os agentes de controle biológico, *Trichoderma* spp. e *Clonostachys rosea*, são incorporados ao solo ou substrato antes do cultivo, também pode ser utilizado para tratamento de mudas, bulbos ou sementes, pulverizados em toda planta ou aplicado por meio de irrigação.

3. REFERÊNCIAS

- AGROFIT. Sistema de agrotóxicos fitossanitários.** 2012. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 20 dez. 2012.
- AKI, A.; PEROSA, J. M. Aspectos da produção e consumo de flores e plantas ornamentais no Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. Campinas, v. 8, p. 13-23, 2002.
- ALEXANDRE, M. A. V.; DUARTE, L. M. L. **Aspectos fitopatológicos de plantas ornamentais.** São Paulo: Instituto Biológico, 2007. p.1-73. (Boletim Técnico, 20).
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology.** New York: John Wiley & Sons, 1996. p. 869.
- ANDREWS, J. H. Biological control in the phyllosphere. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 603-635, 1992.
- ANEFALOS, L. C.; GUINHOTO, J. J. M. Estrutura do mercado brasileiro de flores e plantas ornamentais. **Revista de Agricultura**, São Paulo, v. 50, n. 2, p. 41-63, 2003.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DAS FLORES. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2007. 112 p.
- BAKER, K. F.; COOK, R. J. **Biological control of plant pathogens.** San Francisco: Freeman, 1974. 433 p.
- BÉLANGER, R. R.; DUFOUR, N.; CARON, J.; BENHAMOU, N. Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: Indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 5, p. 41-54, 1995.
- BENDAHMANE, B. S.; MAHIOUT, D.; BENZOHR, I. E.; BENKADA, M. Y. Antagonism of three *Trichoderma* species against *Botrytis fabae* and *B. cinerea*, the causal agents of chocolate spot of faba bean (*Vicia faba* L.) in Algeria. **World Applied Science Journal**, Dubai, v. 17, n. 3, p. 278-283, 2012.
- BENHAMOU, N. Potential of the mycoparasite, *Verticillium lecanii*, to protect citrus fruit against *Penicillium digitatum*, the causal agent of green mold: a comparison with the effect of chitosan. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, n. 4, p. 693-705, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.7.693>>.
- BETTIOL, W. Biopesticides use and research in Brazil. **Outlooks on Pest Management**, Hemehempstead, v. 22, n. 6, p. 280-283, 2011.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico. In: Kimati, H. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1, p. 898-910.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, Z. V.; PAULA JÚNIOR, T. P.; CORRÊA, E. B.; MOURA, A. B.; LUCON, C. M. M.; COSTA, J. C. B.; BEZERRA, J. L. **Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa / CNPMA, 2012. 155 p. (Documentos, 88).

BITTENCURT, M. Consumo interno anima produtores brasileiros de flores. **Rural BR Agricultura**, 07, fev. 2013. Disponível em: <<http://agricultura.ruralbr.com.br/noticia/2013/02/consumo-interno-anima-produtores-brasileiros-de-flores-4037642.html>>. Acesso em: 07 fev. 2013.

BLIND, M.; CEVAT, H.; DERCKX, J. **Ziektebeelden in de bloementeelt**. [S. l.]: Misset DLV De landbouwvoorlichting, 1995. p. 12-14.

BRILMAYER, B. An introduction to the begonia family. In: GRAF, A.B. **Exotica 3: pictorial cyclopedia of exotic plants**. [S. l.]: Roehrs, 1963. 1823 p.

CARRION, G.; RICO-GRAY, V. Mycoparasites on the coffee rust in Mexico. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 11, p. 49-60, 2002.

CAVAT, H. De Fusariumziekte: he` t probleem in de begonias. **Vakblad voor de Bloemisterij**, Doetinchem, v. 42, p. 109, 1993.

CHASE, A. R. *Myrothecium* Leaf Spot of *Begonia*, *Gardenia* Gloxinia and New Guinea Impatiens. In: CHASE, A. R. (Ed.). **Compendium of ornamental foliage plant diseases**. Minnesota: APS Press, 1992. p. 19-20.

CHET, I.; HENIS, Y. Effect of catechol and disodium EDTA on melanin content of hyphal and sclerotial walls of *Sclerotium rolfsii* Sacc. and the role of melanin in the susceptibility of these walls to beta 1,3 glucanase and chitinase. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 1, n. 2, p. 31-38, 1985. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(69\)90003-0](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(69)90003-0)>.

COOK, R. J. B.; BAKER, K. F. (Ed.). **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. Saint Paul: APS Press, 1983. 245 p.

CORABI-ADELL, C.; LUCON, C. M. M.; KOIKE, C. M. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* no estado de São Paulo, aspectos enzimáticos e potencial biocontrolador. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, supl., p. 1-306. 2002.

COSTA, A. S.; MÜLLER, G. W. Tristeza controlled by cross protection, a US-Brazil cooperative success. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 64, n. 6, p. 538-541, 1980. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1094/PD-64-538>>.

DAUGHTREY, M. L.; WICK, R. L.; PETERSON, J. L. **Compendium of flowering potted plant diseases**. Saint Paul: APS Press, 1995. p. 1-2, 11-14, 19-20, 25-28, 39-42, 44-45, 56-57, 61-62.

DE GRUYTER, J.; AUF'M KELLER, A.; VAN KESTEREN, H. A.; MEFFERT, J. P.; VEENBAAS-RIJKS, J. W.; CEVAT, H. N. *Fusarium sacchari* var. *elongatum* – a serious pathogen of Begonia. **Verslagen Mededeeling Plantenziektenk Dienst**, Wageningen, v. 170, p.76-79, 1994.

DEACON, J. W.; BERRY, L. A. Modes of action of mycoparasites in relation to biocontrol of soilborne plant pathogens. In: E. C. TJAMOS, G. C. PAPAVIDAS, AND R. J. (Ed.). **Cook Biological Control of Plant Diseases; Progress and Challenges for the Future**. London: Plenum Press, 1992. P. 157-167.

DIANEZ, F.; SANTOS, M.; BLANCO, R.; TELLO, J. C. Fungicide resistance in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry crops in Huelva (southwestern Spain). **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 30, p. 529-534, 2002.

ELAD, Y. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. **Crop Protection**, Oxford, v, 19, p. 709-714, 2000.

ELAD, Y. Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. **European Journal of Plant Pathology**, Oxford, v. 102, n. 8, p. 719-732, 1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/BF01877146>>.

ELAD, Y.; MALATHRAKIS, N. E.; DIK, A. J. Biological control of *Botrytis*-incited diseases and powdery mildews in greenhouse crops. **Crop Protection**, Oxford, v. 15, p. 229-240, 1996.

ELAD, Y.; SHTIENBERG, D. *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables: chemical, cultural, physiological and biological controls and their integration. **Integrated Pest Management Reviews**, Dordrecht, v. 1, n. 1, p. 15-29, 1995.

ELAD, Y.; SHTINBERG, D. *Trichoderma harzianum* T39 (Trichodex) integrated with fungicides for the control of grey mould of strawberry, vegetable greenhouse-crops and grapes. In: WENHUA, T.; COOK, R.S.; ROVIRA, A. (Ed.) **Advances in biological control of plant diseases**. Beijing: China Agricultural University Press, 1996. p. 310-319.

ELMER, W. H. Preventing spread of *Fusarium* wilt of Hiemalis begonias in the greenhouse. **Crop Protection**, Oxford, v. 27, p. 1078-1083, 2008.

ELMER, W. H.; VOSSBRINCK, C.; GEISER, D. M. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, n. 11, p. 1287, 2004. First report of a wilt disease of Hiemalis Begonias caused by *Fusarium foetens* in the United States. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.11.1287B>>.

EPPO Reporting Service 2003/014. News from the Diagnostic Centre of the Dutch NPPO – 2001. ***Fusarium foetens* (a new disease of begonia)** Disponível em: <http://www.eppo.int/QUARANTINE/Alert_List/deleted%20files/fungi/Fusarium_foetens.doc>.

FOKKEMA, N. J. Opportunities and problems of control of foliar pathogens with micro-organisms. **Pesticide Science**, Tóquio, v. 37, p. 411-416, 1993.

FOSTER, R. Inativação do vírus do mosaico comum do fumo pelo filtrado de culturas de *Trichoderma* sp. **Bragantia**, Campinas, v. 10, p. 139-148, 1950. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87051950000500002>>.

FUJINAWA, M. F.; PONTES, N. C.; SOUZA, E. S. C.; GOES, A.; VALE, H. M. M. First report of *Lasiodiplodia theobromae* causing stem rot disease of begonia (*Begonia x elatior* hort.). **Australasian Plant Disease Notes**, v. 7, p. 163-166, 2012.

FUJINAWA, M. F.; SANTOS, N. F.; PONTES, N. C.; GOES, A.; MORANDI, M. A. B.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Primeiro relato de *Myrothecium* sp. causando mancha foliar em begônia no Brasil. **Tropical Plant Pathology**, Manaus, v. 37, supl., 2012.

GARCIA, S. Produtores de flores comemoram aquecimento do mercado interno. 17 fev. 2012. Disponível em: <<http://agricultura.ruralbr.com.br/noticia/2012/02/produtores-de-flores-comemoram-aquecimento-do-mercado-interno-3667398.html>>. Acesso em: 20 fev. 2013.

GARIBALDI, A.; GULLINO, M. Critical aspects in management of fungal diseases of ornamental plants and directions in research. **Phytopathologia Mediterranea**, Florence, v. 46, n. 2, p. 135-149, 2007.

GOETTEL, M. S.; KOIKE, M.; KIM, J. J.; AIUCHI, D.; SHINYA, R.; BRODEUR, J. Potential of *Lecanicillium* spp. for management of insects, nematodes and plant diseases. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, v. 98, p. 256-261, 2008.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Review Microbiology**, London, v. 2, p. 43-56, 2004.

HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaboi antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. **Applied and Enviromental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 4364-4370, 1994.

HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. **Trichoderma and Gliocladium**. London: Taylor and Francis, 1998. v. 2.

HAUSBECK, M. K.; MOORMAN, G. W. Managing *Botrytis* in greenhouse-grown flower crops. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 80, p. 1211-1219, 1996.

HJELJORD, L. G.; STENSVAND, A.; TRONSMO, A. Effect of temperature and nutrient stress on the capacity of commercial *Trichoderma* products to control *Botrytis cinerea* and *Mucor piriformis* in greenhouse strawberries. **Biological Control**, Orlando, v. 19, p. 149-160, 2000.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, Orlando. v. 87, p. 4-10, 2003.

HUTCHINSON, S. A.; COWAN, M. E. Identification and biological effects of volatile metabolites from cultures of *Trichoderma harzianum*. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 59, p. 71-77, 1972.

JACKSON, D.; SKILLMAN, J.; VANDERMEER, J. Indirect biological control of the coffee leaf rust, *Hemileia vastatrix*, by the entomogenous fungus *Lecanicillium lecanii* in a complex coffee agroecosystem. **Biological Control**, Orlando, v. 61, p. 89-97, 2012.

JARVIS, W. R. **Managing diseases in greenhouse crops**. Harrow: APS Press, 1992. 288 p.

JARVIS, W. R. Managing diseases in greenhouse crops. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 73, p. 190-194, 1989.

JOHNSON, K. B.; SAWYER, T. L.; POWELSON, M. L. Frequency of benzimidazole and dicarboximide resistant strains of *Botrytis cinerea* in western Oregon small fruit and snap bean plantings. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 78, p. 572-577, 1994.

JONES, D. R. Interception PRA for *Fusarium* sp. affecting begonia. CSL UK PPP10122. 2002.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Mercado interno para os produtos da floricultura brasileira: características, tendências e importância socioeconômica recente. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 37-52, 2008.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Inteligência comercial no mercado de flores. In: SEMINÁRIO SETORIAL MERCADO DE FLORES, 14.; SEMANA INTERNACIONAL DE FRUTICULTURA, FLORICULTURA E AGROINDÚSTRIA, 2007, Fortaleza. **Palestra...** 1 CD-ROM.

JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ, M.S. Os pólos de produção de flores e plantas ornamentais do Brasil: uma análise do potencial exportado. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 8, p. 25-47, 2002.

JUNQUEIRA, N. T. V.; GASPAROTTO, L. Controle biológico de fungos estromáticos causadores de doenças foliares em seringueira. In: BETTIOL, W. (Org.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna, SP: Embrapa-CNPDA, 1991. v. 1, p. 307-331. (Documentos, 15).

JUNQUEIRA, N.T.V.; GASPAROTTO, L. Controle biológico de fungos estromáticos causadores de doenças foliares em seringueira. In: Bettiol, W. (Org.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna, SP: Embrapa-CNPDA, 1991. v.1, p.307-331. (Embrapa-CNPDA. Documentos, 15).

KARLSSON, M. G.; HEINS, R. D. Begonias. In: LARSON, R. A. (Ed.). **Introduction to floriculture**. Academic Press, 1992. p. 409-428.

KIYUNA, I.; ÂNGELO, J. A.; COELHO, P. J. **Comportamento do comércio exterior brasileiro no primeiro trimestre de 2004**. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=1420>>. Acesso em: 20 fev. 2013.

KÖHL, J.; FOKKEMA, N. J. Strategies for biological control of necrotrophic fungal foliar pathogens. In: BOLAND, G. J.; KUYKENDALL, L. D. (Ed.). **Plant-Microbe interactions and biological control**. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 49-88.

KÖHL, J.; GERLAGH, M.; DE HAAS, B. H.; KRIJGER, M. C. Biological control of *Botrytis cinerea* in cyclamen with *Ulocladium atrum* and *Gliocladium roseum* under commercial growing conditions. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, p. 568-575, 1998.

KUBICEK, C. P.; HARMAN, G. E. *Trichoderma* and *Gliocladium*. London: Taylor and Francis, 1998. v. 1.

LAMONDIA, J. A.; DOUGLAS, S. M. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from Connecticut greenhouses to benzimidazole and dicarboximide fungicides. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, p. 729-732, 1997.

LARSON, R. A. Begonias. In: _____. (Ed.) **Introduction to floriculture**. New York: Academic Press, 1980. p. 395-340.

LI, D.-W.; SUTTON, J. C.; PENG, G. *Gliocladium roseum* effectively suppresses *Botrytis cinerea* in greenhouse-grown begonia. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, p. 1191, 1995.

LI, G. Q., HUANG, H. C., KOKKO, E. G., ACHARYA, S. N. Ultrastructural study of mycoparasitism of *Gliocladium roseum* on *Botrytis cinerea*. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 43, p. 211-218, 2002.

LI, G. Q.; HUANG, H. C., ACHARYA, S. N., ERICKSON, R. S. Biological control of blossom blight of alfalfa caused by *Botrytis cinerea* under environmentally controlled and field conditions. **Plant Disease**, Saint Paul. v. 88, p. 1246-1251, 2004.

LUMSDEN, R. D. Hyperparasitism for control of plant pathogens. In: PIMENTEL, I. **CRC handbook of pest management in agriculture**. Boca Raton: CRC Press, 1981. p. 475-484.

MALATHRAKIS, N. E.; KLIRONOMOU, E. J. Control of grey mould of tomatoes in greenhouses with fungicides and antagonists. In: VERHOEFF, K.; MALATHRAKIS, N. E.; WILLIAMSON, B. (Ed.). **Recent advances in Botrytis research**. Wageningen: Pudoc Science, 1992. p. 282-286.

MANGANDI, J. A.; SEIJO, T. E.; PERES, N. A. First Report of *Myrothecium roridum* causing *Myrothecium* leaf spot on *Salvia* spp. in the United States disease report. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, p. 772, 2007.

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 1, p. 369-409, 1993.

MCQUILKEN, M. P.; GEMMELL, J.; LAHDENPERA, M. L. *Gliocladium catenulatum* as a potential biological control agent of damping-off in bedding plants **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 149, n. 3-4, p. 171-178, 2001.

MEJIAS, R. J.; RUANO, M. C. **El cultivo industrial de plantas em maceta**. Reus: Ediciones de Horticultura, 1990. p. 664.

MEYER, G.; BIGIRIMANA, J.; ELAD, Y.; HOFTE, M. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 and biocontrol of *Botrytis cinerea*. **European Journal of Plant Pathology**, Oxford, v. 104, p. 279-286, 1998.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 7-14.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Integração de métodos biocompatíveis no manejo de doenças e pragas: experiência em plantas ornamentais e medicinais. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 33, supl., p. 31-34, 2008.

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

MORANDI, M. A. B.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G.; ALFENAS, A. C.; BARBOSA, J. G.; CRUZ, C. D. Relationships of microclimatic variables to colonization of rose debris by *Botrytis cinerea* and the biocontrol agent *Clonostachys rosea*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 16, p. 619-630, 2006.

MORANDI, M. A. B.; MAFFIA, L. A.; SUTTON, J. C. Development of *Clonostachys rosea* and interactions with *Botrytis cinerea* in rose leaves and residues. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 29, p. 1-11, 2001.

MOTOS, J. R.; PACHECO, M. M. Mercado internacional de flor y verdes de corte. **Revista de Horticultura**, v. 18, p. 32-36, 2004.

MÜLLER, G. W.; COSTA, A. S. Search for outstanding plants in tristeza infected citrus orchards: the best approach to control the disease by preimmunization. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 19, n. 2, p. 197-198, 1987.

MYRESIOTIS, C. K.; KARAOGLANIDIS, G. S.; TZAVELLA-MONARI, K. Resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, hydroxylanilide, benzimidazole, and dicarboximide fungicides. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, p. 407-413, 2007.

NOBRE, S. A. M.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G.; COTA, L. V.; DIAS, A. P. S. Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. **Biological Control**, Orlando, v. 34, p. 132-143, 2005.

O'NEILL, T. M.; BENNISON, J. A.; SCRACE, J. M. Pests and diseases of protected ornamental flower. In: ALFORD, D. (Ed.). **Pest and disease management handbook**. Oxford: Blackwell Science, 2000. p. 374-428.

PACHENARI, A.; DIX, N. J. Production of toxins and wall degrading enzymes by *Gliocladium roseum*. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 74, p. 561-566, 1980.

PAK, H. A.; BEEVER, R. E.; LARACY, E. P. Populations dynamics of dicarboximide-resistant strains of *Botrytis cinerea* on grapevine in New Zealand. **Plant Pathology**, Oxford, v. 39, p. 501-509, 1990.

PAULITZ, T. C. Population dynamics of biocontrol agents and pathogens in soils and rhizospheres. **European Journal of Plant Pathology**, Oxford, v. 106, p. 401-413, 2000.

PAULITZ, T. C.; BÉLANGER, R. R. Biological control in greenhouse systems. **Annual Review Phytopathology**, v. 39, p. 103-133, 2001.

PENG, C. I.; LIU, Y.; KU, S. M. *Begonia fangii* (sect. Coelocentrum, Begoniaceae), a new species from limestone áreas in Guanxi, China. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 46, p. 83-89, 2005.

PENG, G.; SUTTON, J. C. Biological methods to control grey mould of strawberry. **Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases**, Alton, v. 1, p. 233-240, 1990.

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

PFENNING, L. H.; LIMA, C. S. Descrição das espécies de *Fusarium*. In: TROPICAL FUSARIUM WORKSHOP, 2012, Lavras. **Treinamento...**

QUEZADO-DUVAL, A. M.; HENZ, G. P.; PAZ-LIMA, M. L.; MEDEIROS, A. R.; MIRANDA, B. E. C.; PFENNING, L. H.; REIS, A. New hosts of *Myrothecium* spp. in Brazil and a preliminary in vitro assay of fungicides. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 41, p. 246-252, 2010.

REYNOLDS, D.; DEVRIES, D.; CARNEY, L. Begonia. In: BALL, V. (Ed.). **Ball red book**. Batavia: Ball Publishing, 1998. p. 388-395.

ROCHFORD, T.; GORER, R. **The Rochford book of flowering pot plants**. Londres: The Trinity Press, 1974. p. 168.

SAMUELS, G. J. **A revision of the fungi formerly classified as *Nectria* subgenus *Hyphonectria***. New York: Botanical Garden Press, 1996. v. 26, p. 1-126.

SAURAT, C.; FOURRIER, C.; WILSON, V. First report of *Begonia Elatior* Wilt disease caused by *Fusarium foetens* in France. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 97. n. 1, p. 144, 2013.

SCHROERS, H. J.; BAAYEN, R. P.; MEFFERT, J. P.; DE GRUYTER, J.; HOOFTMAN, M.; O'DONNELL K. *Fusarium foetens*, a new species pathogenic to begonia elatior hybrids (*Begonia · hiemalis*) and the sister taxon of the *Fusarium oxysporum* species complex. **Mycologia**, New York, v. 96, p. 393-406, 2004.

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

SEABROOK, P.; ROCHFORD, T. C. **Plants for your home**. [S.l.]: Editions Floraisse, 1974.

SEKINE, T.; KANNO, H.; AOKI, T. Occurrence of leaf and stem rot caused by *Fusarium foetens* in begonia elatior hybrids (*Begonia X hiemalis*). **Japanese Journal of Phytopathology**, Tokyo, v. 74, p. 164-166, 2008.

SHAW, D. E. *Verticillium lecanii* a hyperparasite on the coffee rust pathogen in Papua New Guinea. **Australasian Plant Pathology**, Adelaide, v. 17, n. 1, p. 2-3, 1988.

SILVERA-PÉREZ, A. E.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; DUARTE, V.; SANTOS, H. P.; FELIPPETO, J. Controle do mofo cinzento com *Clonostachys rosea* na produção de mudas de fúcsia. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 35, p. 163-169, 2010.

SIVAN, A.; CHET, I. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 79, p. 198-203, 1989.

SIVASITHAMPARAM, K.; CHISALBERTI, E. L. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: KUBICEK C. P.; HARMAN, G. E. (Ed.). **Trichoderma and Gliocladium**. London: Taylor & Francis, 1998. p. 139-191.

SUDO, S. Biocontrole de *Catacauma torrendiella* e *Coccostroma palmicola*, agentes causadores da lixa preta do coqueiro. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 1989, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: USP/EMBRAPA, 1989. p. 57-59.

SURGEONER, G. Pest management research: plant program. Ontário: University of Guelph- Presented to the Agricultural Research of Ontario, 1998. 162 p.

SUTTON, J. C.; LI, D. W.; PENG, G.; YU, H.; ZHANG, P.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. *Gliocladium roseum* : a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, p. 316-328, 1997.

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

TATAGIBA, J.S., MAFFIA, L.A., BARRETO, R.W., ALFENAS, A.C., SUTTON, J.C. Biological control of *Botrytis cinerea* in residues and flowers of rose (*Rosa hybrida*) **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 26, p. 8-19, 1998.

THOMAS, D. C.; HUGHES, M. *Begonia varipeltata* (Begoniaceae): a new peltate species from Sulawesi, Indonesia. **Edinburg Journal of Botany**, v. 65, p. 3, p. 369-374, 2008.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. Possibilidades do controle biológico de *Phytophthora* em macieira. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna:Embrapa-CNPMA,1991. p. 303-305.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; SUTTON, J. C.; PERAZZOLO, I.; CZERMAINSKI, A. B. C. Controle biológico de *Botrytis cinerea* em morangueiros cultivados em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 69-73, 1997.

VERHAAR, M. A.; OSTERGAARD, K. K.; HIJWEGEN, T.; ZADOCS, J. C. Preventative and curative applications of *Verticillium lecanii* for biological control of cucumber powdery mildew. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 7, n. 4, p. 543-552, 1997.

XUE, A. G. Biological control of pathogens causing root rot complex in field pea using *Clonostachys rosea* strain ACM941. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, p. 329-335, 2003.

YE, H. G.; WANG, F. G.; YE, Y. S.; PENG, C. I. *Begonia coptidifolia* (Begoniaceae), a new species from China. **Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 45, p. 259-266, 2004.

YOURMAN, L. F.; JEFFERS, S. N. Resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, p. 569-575, 1999.

YU, H.; SUTTON, J. C. Effectiveness of bumblebees and honeybees for delivering inoculum of *Gliocladium roseum* to raspberry flowers to control *Botrytis cinerea*. **Biological Control**, Orlando, v. 10, p. 113-122, 1997.

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

ZIMAND, G.; ELAD, Y.; CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, p. 1255-1260, 1996.

CAPÍTULO 2 - CONTROLE BIOLÓGICO DO MOFO CINZENTO E DA MANCHA DE MIROTÉCIO EM BEGÔNIA

RESUMO – O presente trabalho teve como objetivo avaliar o antagonismo de *Clonostachys rosea* LQC62 e *Trichoderma asperellum* LQC96 a *Botrytis cinerea* e *Myrothecium roridum*, patógenos foliares de begônia, e avaliar a aplicação destes antagonistas no manejo da doença em cultivo comercial. Em condições controladas *in vitro*, avaliou-se a produção de compostos solúveis e voláteis, o parasitismo em culturas pareadas, a competição por colonização em discos de folhas de begônia e o efeito da aplicação dos antagonistas em diferentes concentrações e período de aplicação. Por fim, avaliou-se a utilização dos antagonistas no controle do mofo cinzento e da mancha de Mirotécio em cultivo comercial de begônia. Tanto LQC62 quanto LQC96 produziram compostos solúveis em meio de cultura capazes de inibir o desenvolvimento de *B. cinerea*, o mesmo não sendo observado para *M. roridum*. Ambos os antagonistas produziram compostos voláteis que propiciaram a redução no desenvolvimento dos patógenos. Houve sobreposição das colônias dos antagonistas sobre a dos patógenos, indicando atividade hiperparasítica. Os antagonistas colonizaram os discos de folhas de begônias e os tratamentos com aplicação destes antagonistas previamente à inoculação dos patógenos promoveram a redução na esporulação dos patógenos em até 100%. Pulverizações foliares semanais de LQC62 reduziram a incidência do mofo cinzento e da mancha de Mirotécio em cultivo comercial de begônia.

Palavras chaves: *Begonia elatior*, *Botrytis cinerea*, *Clonostachys rosea*, *Myrothecium roridum*, *Trichoderma asperellum*.

CHAPTER 2 - BIOLOGICAL CONTROL OF GRAY MOLD AND MYROTHECIUM LEAF SPOT IN BEGONIA

ABSTRACT – The objective of the present study is to evaluate the antagonism of *Clonostachys rosea* LQC62 and *Trichoderma asperellum* LQC96 for *Botrytis cinerea* and *Myrothecium roridum*, which are begonia leaf pathogens, and evaluate the application of these antagonists in the management of the disease in commercial cultivation. Under controlled *in vitro* conditions, the production of soluble and volatile compounds was evaluated along with parasitism in paired cultures, competition by colonization in begonia leaf discs, and the effect of the application of the antagonists in the control of gray mold and Myrothecium leaf spot in the commercial cultivation of begonia. Both LQC62 and LQC96 produced soluble compounds in a culture medium that were capable of inhibiting the development of *B. cinerea*, which was not observed for *M. roridum*. Both the antagonists produced volatile compounds that led to a reduction in the development of the pathogens. There was an overlap of the colonies of the antagonists with those of the pathogens, indicating hyper-parasitic activity. The antagonists colonized the begonia leaf discs, and the application of these antagonists prior to inoculation promoted a reduction in the sporulation of the pathogens of up to 100%. Weekly foliar sprays of LQC62 reduced the incidence of gray mold and of Myrothecium leaf spot in commercial cultivation.

Keywords: *Begonia elatior*, *Botrytis cinerea*, *Clonostachys rosea*, *Myrothecium roridum*, *Trichoderma asperellum*.

1. INTRODUÇÃO

As cultivares de *Begonia elatior* são plantas provenientes do cruzamento de *B. socotrana* Hook. x *B. tuberhybrida* Voss, estão entre as dez flores mais vendidas na Europa Ocidental (REYNOLDS et al., 1998). Isso ocorre em função de plantas deste gênero apresentarem grande diversidade de cores das inflorescências, bem como em função da resposta ao fotoperíodo e da longevidade das inflorescências (LARSON, 1980; REYNOLDS et al., 1998).

Na cultura da begônia, incidem doenças ocasionadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides, que demandam um manejo eficiente para evitar danos econômicos e sua depreciação (ALEXANDRE; DUARTE, 1995). Dentre as doenças foliares de etiologia fúngica, destacam-se o mofo cinzento e a mancha de Mirotécio (ALEXANDRE; DUARTE, 1995; DAUGHTREY; WICK; PETERSON, 1995; FUJINAWA et al., 2012).

O mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea* Pers.: Fr., cuja forma perfeita é o ascomyceto *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel, é uma das doenças mais comuns e amplamente distribuídas. O agente causal é patogênico a mais de 200 gêneros de plantas (JARVIS, 1992; ELAD et al., 2004; AGRIOS, 2005; WILLIAMSON et al., 2007), podendo afetar todos os órgãos da parte aérea, o que torna o seu controle muito difícil (GULLINO, 1992; DAUGHTREY; WICK; PETERSON, 1995). Os sintomas que incita em begônias são lesões foliares irregulares de coloração marrom com halos concêntricos apresentando abundante esporulação de coloração cinza.

A mancha de Mirotécio em begônias foi descrita recentemente no Brasil por FUJINAWA et al. (2012), e tem como agente causal o fungo *Myrothecium roridum* Tode: Fr, o qual também possui uma ampla gama de hospedeiros, incluindo ornamentais como gardênia, gloxínia, maria-sem-vergonha, sálvia, vrisea, lírio da paz, tango, antúrio e comigo-ninguém-pode (CHASE, 1992; MANGANDI et al., 2007; QUEZADO-DUVAL et al., 2010). Os sintomas em begônias são manchas foliares inicialmente pequenas e circulares evoluindo para irregulares, de coloração castanho claras sendo que nessas lesões há a presença de esporodóquios de

coloração verde-escuro com formatos irregulares (DAUGHTREY; WICK; PETERSON, 1995; FUJINAWA et al., 2012).

As medidas preconizadas para o controle dessas doenças se baseiam no controle químico, sendo registrados produtos a base de tiofanato-metílico e clorotalonil, para o controle do mofo cinzento enquanto que para a mancha de Mirotécio não existem fungicidas registrados no Brasil (Agrofit, 2012). Um complicador para a eficiência do controle químico do mofo cinzento é a ocorrência de resistência a fungicidas observadas em isolados de *B. cinerea* (PAK et al., 1990; JOHNSON; SAWYER; POWELSON, 1994; LAMONDIA; DOUGLAS, 1997; YOURMAN; JEFFERS, 1999; DIANEZ et al., 2002; MYRESIOTIS et al., 2007). Além do controle químico, práticas culturais, como controle do ambiente, eliminação de restos culturais, sanitização e rouguing, são preconizadas (JARVIS, 1989; DAUGHTREY; WICK; PETERSON, 1995; HAUSBECK; MOORMAN, 1996).

O controle biológico tem sido uma alternativa estudada para o manejo de doenças em plantas ornamentais. Para o mofo cinzento, um agente de controle biológico bastante estudado é o fungo *Clonostachys rosea*, anteriormente classificado como *Gliocladium roseum* (SAMUELS, 1976; SCHROERS et al., 1999). Os primeiros trabalhos com *C. rosea* iniciados no final da década de 1980, mostraram que este antagonista é capaz de suprimir a esporulação de *B. cinerea* em folhas, pétalas e estames de morangueiro, com eficácia igual ou superior a captan, fungicida padrão no controle da doença (PENG; SUTTON, 1991). Deste então, este fungo tem sido testado no controle de *B. cinerea* em outros hospedeiros, em ornamentais como gerânio, begônia, ciclâmen, rosa e fúcsia (SUTTON et al., 1997; TATAGIBA, et al., 1998; KÖHL et al., 1998; MORANDI; SUTTON; MAFFIA, 2000; MORANDI et al., 2003, MORANDI et al., 2006; SILVERA-PÉREZ et al., 2010). *Clonostachys rosea* reduz o desenvolvimento e esporulação de *B. cinerea* por competição por nutrientes, hiperparasitismo, competição na colonização de tecidos senescentes e tecidos mortos (SUTTON et al., 1997; YU; SUTTON, 1997a; KÖHL; FOKKEMA, 1998; MORANDI et al., 2001).

Da mesma forma, *Trichoderma* spp. têm sido amplamente utilizado como agentes de controle biológico tanto no controle de patógenos foliares e quanto para patógenos do solo (ANDREWS, 1992; ELAD, 2000; PAULITZ, 2000; PAULITZ;

BÉLANGER, 2001). O isolado de *T. harzianum* T39 foi primeiramente desenvolvido para o controle do mofo cinzento na cultura da uva, e atualmente é um dos agentes de controle biológico mais utilizado para o biocontrole do mofo cinzento em casa de vegetação (MALATHRAKIS; KLIRONOMOU, 1992; ELAD; SHTIENBERG, 1995; ELAD; SHTIENBERG, 1996; ELAD, 1996; HJELJORD; STENSVAND; TRONSMO, 2000) e age na prevenção da infecção, inibindo a germinação dos esporos do *B. cinerea*, além de prevenir a penetração do patógeno, inibindo o seu processo de degradação dos tecidos vegetais (ZIMAND et al., 1996).

Apesar dos exemplos enumerados acima, para o controle da mancha de Mirotécio, não foram encontrados estudos quanto a utilização de agentes de controle biológico no manejo da doença. Sendo assim o objetivo deste trabalho foi estudar os mecanismos envolvidos no antagonismo de *C. rosea* LQC62 e *T. asperellum* LQC96 aos patógenos, *B. cinerea* e *M. roridum*, e sua utilização como ferramenta de manejo do mofo cinzento e da mancha de Mirotécio em begônia.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção dos isolados dos antagonistas e patógenos e sua preservação

Os isolados dos patógenos *B. cinerea* e *M. roridum* foram obtidos de plantas sintomáticas provenientes de áreas de cultivo comercial de begônias no município de Jacareí, São Paulo, Brasil (23°15'58.45"S e 46° 2'32.24"O). Após o isolamento, esses isolados foram inoculados em plantas sadias de begônia, a fim de verificar a patogenicidade destes. Os isolados dos antagonistas, *C. rosea* e *T. asperellum*, foram selecionados na coleção do LQC (Laboratório de Quarentena Costa Lima) da Embrapa Meio Ambiente - Jaguariúna SP, com base em estudos preliminares de antagonismo a outros fitopatógenos. Assim, optou-se pelos isolados LQC62 de *C. rosea*, obtido de cultivos de rosa e LQC96 de *T. asperellum*, isolado de amostras de solo cultivado com feijão.

Todos os isolados foram preservados pelo método de Castellani e preservação em papel filtro mantida em frascos contendo sílica gel. Amostras dos

patógenos também foram mantidas herborizadas folhas com sintomas e sinais típicos das doenças.

2.2. Avaliação da produção de metabólitos solúveis e voláteis e do hiperparasitismo de *Clonostachys rosea* e *Trichoderma asperellum* a *Botrytis cinerea* e *Myrothecium roridum*

Para a avaliação da produção de compostos solúveis, por *T. asperellum* LQC96, foi utilizado o método do celofane (GIBBS, 1967; DENNIS; WEBSTER, 1971a). Um disco de papel celofane autoclavado foi colocado de forma asséptica recobrimdo toda superfície do meio BDA vertido em placas de Petri. Sobre o papel celofane, depositou-se um disco de 0,5 cm de diâmetro da cultura de LQC96. A cultura foi incubada por 48 horas a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, removeu-se o papel celofane juntamente com a colônia de LQC96 e depositou-se disco de 0,5 cm de diâmetro da colônia dos patógenos ao centro da placa de Petri. As testemunhas consistiram do cultivo do patógeno em placas onde não se cultivou LQC96 sobre o celofane. Todas as culturas foram incubadas a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 horas.

Como o cultivo de *C. rosea* (LQC62) sobre o papel celofane ocasiona a degradação deste em função da atividade celulolítica apresentada por este isolado (FUJINAWA et al., 2011), o antagonismo pela produção de compostos solúveis foi avaliado pela adição de filtrado da cultura líquida de LQC62 em meio BDA e cultivo dos fitopatógenos neste meio. Para tal, LQC62 foi cultivado em meio BD (Batata-Dextrose) durante uma semana sob agitação contínua. A cultura líquida foi filtrada com membrana para filtro microbiológico (Millipore®) de $0,02\mu\text{m}$, e o filtrado obtido foi adicionado em meio BDA fundente na concentração de 20% (v/v). A mistura foi vertida para placas de Petri, onde foi colocado um disco da colônia de 0,5 cm do patógeno (*B. cinerea* e *M. roridum*). As testemunhas consistiram no cultivo do patógeno no meio BDA sem a adição do filtrado. Em ambos os casos, foram realizadas avaliações diárias do crescimento micelial até que nas testemunhas, as colônias atingissem os bordos da placa, conforme Bendahmane et al., (2012).

Utilizaram-se como variáveis, o diâmetro final da colônia, a área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) e a taxa de crescimento da colônia.

Os ensaios foram conduzidos no delineamento inteiramente casualizado, com 6 tratamentos (LQC62-*B. cinerea*, LQC62-*M. roridum*, LQC96-*B. cinerea*, LQC96-*M. roridum*, testemunha-*B. cinerea* e testemunha-*M. roridum*), contendo 10 repetições para cada tratamento.

Para avaliar a produção de metabólitos voláteis com ação antifúngica, foi utilizado o método baseado em Bharat et al. (1980) e Schrimbock et al. (1994), que consiste em posicionar dois fundos de placas de Petri umas sobre as outras, contendo em cada uma, culturas do antagonista e do patógeno. Na placa inferior, semeou-se o antagonista e na outra, o patógeno, ambos na forma de discos da colônia (0,5 cm). Lateralmente, as placas foram vedadas com Parafilm®. As culturas foram incubadas em temperatura ambiente, por sete dias, sob luz fluorescente contínua. No tratamento controle, o patógeno foi cultivado em ambos os fundos das placas de Petri. Comparou-se o desenvolvimento dos patógenos expostos aos antagonistas em relação ao crescimento no tratamento controle, medindo-se o crescimento diário da colônia dos patógenos. Utilizaram-se como variáveis, o diâmetro final da colônia, a área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) e a taxa de crescimento da colônia (cm.dia⁻¹).

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, contendo 6 tratamentos, com cinco repetições para cada tratamento.

Para avaliar o hiperparasitismo, utilizou-se o método de culturas pareadas entre patógeno e antagonista, seguindo a metodologia modificada de Patel e Brown (1969). Para tal, foram repicados discos de 0,5 cm de diâmetro da colônia do patógeno e do antagonista colocadas a 6,5cm de distância entre eles, em placas de Petri contendo meio BDA. As testemunhas consistiram na adição apenas do disco da colônia do patógeno ou do antagonista, em uma das extremidades de cada placa.

A avaliação foi quantitativa, medindo-se diariamente o crescimento das colônias fúngicas, sendo realizadas até que as colônias do patógeno e do antagonista se encontrassem. A partir deste momento, avaliou-se a sobreposição de uma colônia sobre a outra até que as colônias das testemunhas colonizassem toda a placa. Determinou-se a redução no diâmetro da colônia e redução na taxa de

crescimento tanto do patógeno como do antagonista em relação ao tratamento controle, tendo-se por base o tempo de encontro entre as colônias. A fim de confirmar o hiperparasitismo, lâminas contendo discos de colônias com o antagonista e patógeno foram montadas e observadas no microscópio óptico o ponto de encontro dessas hifas. O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, contendo 6 tratamentos, com 10 repetições para cada tratamento.

2.3. Antagonismo em discos de folha de begônia de *Clonostachys rosea* e *Trichoderma asperellum* a *Botrytis cinerea* e *Myrothecium roridum*

A colonização de discos de folhas de begônia pelos antagonistas e o seu efeito sobre os patógenos, foi avaliado segundo a metodologia descrita por Eskes (1982). Para o teste foram utilizadas caixas plásticas do tipo Gerbox, previamente desinfestadas pela imersão em hipoclorito de sódio a 10% por 24 horas e exposição à luz UV por 8 horas. Em cada caixa, foi adicionada água destilada esterilizada e sob uma tela metálica, também estéril, depositaram-se 50 discos de folhas de begônia da cv. Verônica de 1 cm de diâmetro, previamente desinfestados por imersão em álcool 70% (1min), hipoclorito de sódio 5% (1min), e lavadas três vezes com água destilada autoclavada, sendo secas sobre papel filtro sob condições assépticas. Após a disposição dos discos de folha nas caixas, realizou-se a inoculação do antagonista e patógeno, por pulverização na face adaxial dos discos em concentrações. Foram avaliadas três concentrações dos antagonistas (1×10^5 , 1×10^6 e 1×10^7 conídios.ml⁻¹) e cinco períodos de aplicação (inoculação do antagonista 48 e 24 horas antes do patógeno, inoculação simultânea e inoculação do antagonista 48 e 24 horas depois do patógeno). A concentração do patógeno utilizado foi de 1×10^5 conídios.ml⁻¹. Após as inoculações, os discos foram mantidos por 24 horas nas caixas de plástico e em seguida, foram transferidos para meio PCA (Paraquat-Choramphenicol-Ágar). As testemunhas consistiram na pulverização apenas de: i) água destilada esterilizada, ii) apenas suspensão do patógeno na concentração de 1×10^5 conídios.ml⁻¹, e iii) apenas suspensão do antagonista nas três concentrações mencionadas. A parcela experimental foi constituída de 10

discos por placa, com cinco repetições para cada tratamento. Avaliou-se o percentual de área dos discos colonizados a partir do quarto, sétimo e décimo dia após a inoculação, utilizando-se diagrama de notas. Para *B. cinerea*, utilizou-se a escala de Peng e Sutton (1991): 0= 0; 1= 1-12; 2= 13-24; 3= 25-48; 4= 49-100; 5= 101-200; 6= 201-300; 7= 301-400 conidióforos por disco de folha. Para *C. rosea* e *T. asperellum*, utilizou-se a escala de Nobre et al., (2005): 0= 0; 1= 0-3; 2= 3-6; 3= 6-12; 4= 12-25; 5= 25-37; 6= 37-50 e 7= mais que 50% da área dos discos colonizados (NOBRE et al., 2005). Para *M. roridum*, foi quantificado o número de esporodóquios por disco de folha. Com base nas avaliações do desenvolvimento dos patógenos nas testemunhas e nas parcelas tratadas com os antagonistas, avaliou-se o percentual de redução da colonização pelo patógeno em função da concentração e do período de aplicação em relação à inoculação.

2.4. Controle biológico do mofo cinzento e da mancha de Mirotécio em cultivo comercial de begônias

Para avaliar a eficiência dos antagonistas no manejo integrado do mofo cinzento e da mancha de Mirotécio, a aplicação dos antagonistas foi incorporada às práticas de manejo fitossanitário em uma produção comercial com 4 ha de produção em cultivo protegido, com sistema de fertirrigação, localizada no município de Jacareí (São Paulo, Brasil). Acompanhou-se três ciclos de produção, sendo os ensaios conduzidos a partir da semana 19, 20 e 21, na qual se refere a semana do dia 09 de maio, 16 de maio e 23 de maio de 2011 respectivamente, em cultivos de mini-begônias (pote 11) da cultivar Borias. Os trabalhos de irrigação, nutrição mineral e manejo de pragas foram realizados conforme o manejo adotado pelo produtor. Foram avaliados cinco tratamentos: i) testemunha não tratada (pulverizada apenas com água destilada), ii) tratamento padrão do produtor, com aplicação no plantio e na sexta semana com tiofanato metílico (Cercobin[®] 700 WP, Iharabras S.A. Indústria Químicas) e na décima segunda semana com hidróxido de cobre (Kocide[®] WDG, Du Pont do Brasil S.A.) iii) uma única aplicação no substrato de LQC96 antes do plantio (aplicação via solo com suspensão 1×10^7 conídios.mL⁻¹), iv) aplicações foliares semanais de LQC62 (1×10^7 conídios.mL⁻¹), e v) aplicação no substrato de

LQC96 pré-plantio, seguida do tratamento padrão adotado pelo produtor. Optou-se pela dispensa de *T. asperellum* via solo por ser uma prática já adotada na propriedade. Foram realizadas avaliações semanais durante as 18 semanas do ciclo de cultivo, observando-se a ocorrência natural de mofo cinzento e mancha de Mirotécio. A parcela experimental foi constituída por 10 vasos, sendo o delineamento experimental em blocos ao acaso com seis repetições para cada tratamento. Os tratamentos foram comparados com base na incidência final e nos valores de área abaixo da curva de progresso das doenças (AACPD).

2.5. Análises estatísticas

As análises foram realizadas utilizando-se os procedimentos UNIVARIATE e GLM no programa SAS 9.1 (SAS Institute, Cary, N.C., USA). Alguns dados foram transformados para raiz quadrada de $(x/2+1)$, a fim de se atender os pressupostos de normalidade e homocedasticidade da análise de variância (ANOVA). Atendidos estes pressupostos, esta foi efetuada e, quando observado efeito significativo dos tratamentos (F , $P \leq 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste t de Student (t , $P \leq 0,05$). Nos casos onde os fatores avaliados apresentavam níveis quantitativos, realizou-se análise de regressão para os fatores que apresentaram efeito significativo na análise de variância (F , $P \leq 0,05$). Todos os experimentos foram repetidos, no mínimo, duas vezes. Nestes casos, realizou-se análise conjunta dos ensaios conforme recomendações descritas por Pimentel-Gomes e Garcia (2002).

3. RESULTADOS

3.1. Avaliação da produção de metabólitos solúveis e voláteis e do hiperparasitismo de *Clonostachys rosea* e *Trichoderma asperellum* a *Botrytis cinerea* e *Myrothecium roridum*

Compostos solúveis de *T. asperellum* LQC96 reduziram o desenvolvimento de *B. cinerea*, com redução significativa (F , $P \leq 0,0001$) do diâmetro da colônia, da AACPCM e da taxa de progresso do crescimento da colônia em relação à

testemunha. No entanto, não houve nenhum efeito significativo do LQC96 sobre *M. roridum*, (F, $P \leq 0,05$) (Tabela 1).

A adição de filtrado de cultura de *C. rosea* LQC62 ao meio BDA promoveu redução significativa no diâmetro da colônia e na taxa de crescimento das colônias de *B. cinerea* (F, $P \leq 0,01$). Para *M. roridum*, semelhantemente ao LQC96, LQC62 não afetou significativamente o desenvolvimento do patógeno (F, $P \leq 0,05$) (Tabela 2).

Ambos antagonistas produziram compostos voláteis com atividade inibitória contra os patógenos, sendo observada redução no crescimento de ambos os patógenos para todas as variáveis avaliadas (Tabela 3). O efeito sobre *B. cinerea* foi mais proeminente. Para ambos os patógenos, o efeito inibitório causado pelos compostos voláteis de LQC62 foram maiores, com taxas de redução de crescimento superiores a 50%.

No cultivo pareado, verificou-se redução no crescimento de *M. roridum* de aproximadamente 23 e 26% no diâmetro da colônia, e 28 e 29% na taxa de crescimento, na presença de LQC62 e LQC96, respectivamente (Tabela 4).

Para *B. cinerea*, ambos os antagonistas reduziram em aproximadamente 28% o diâmetro da colônia do patógeno, porém não foi observado efeito significativo para taxa de crescimento (t, $P \leq 0,05$) (Tabela 5).

Tanto para *B. cinerea* quanto para *M. roridum* observou-se sobreposição dos antagonistas, demonstrando capacidade hiperparasítica, sendo maior a sobreposição de LQC96 sobre *M. roridum* (Tabela 4) e de LQC62 sobre *B. cinerea* (Tabela 5). O hiperparasitismo de LQC62 e LQC96 foi confirmado por meio da observação da interação das hifas em microscópio óptico (Figura 1).

Verificou-se também no cultivo pareado, a redução no desenvolvimento dos antagonistas, de aproximadamente 16 e 27% no diâmetro da colônia, e 14 e 33% na taxa de crescimento de LQC62 e LQC96, respectivamente, quando pareado com *M. roridum* e a redução de 21 e 31% no diâmetro da colônia, e 23 e 31% na taxa de crescimento de LQC62 e LQC96, respectivamente, quando pareado com *B. cinerea*.

Tabela 1. Avaliação da produção de compostos solúveis pelo método do papel celofane, utilizando o antagonista, *Trichoderma asperellum* (LQC96) com atividade inibitória à *Botrytis cinerea* e *Myrothecium roridum*, com base no diâmetro final da colônia (Diâmetro), da área abaixo da curva de crescimento micelial (AACPCM) e da taxa de crescimento (Taxa).

	<i>B. cinerea</i>			<i>M. roridum</i>		
	Compostos solúveis	Controle LQC96	P > F	Compostos solúveis	Controle LQC96	P > F
Diâmetro (cm)	1,99	8,50	<0,0001	5,36	5,59	0,12
AACPCM	5,16	31,13	<0,0001	31,41	31,29	0,95
Taxa	0,31	1,13	<0,0001	0,51	0,54	0,06

Tabela 2. Avaliação da produção de compostos solúveis pelo método da adição filtrado do meio líquido cultivado com *Clonostachys rosea* (LQC62) com atividade inibitória à *Botrytis cinerea* e *Myrothecium roridum*, com base no diâmetro final da colônia (Diâmetro), da área abaixo da curva de crescimento micelial (AACPCM) e da taxa de crescimento (Taxa).

	<i>B. cinerea</i>			<i>M. roridum</i>		
	Compostos solúveis	Controle LQC62	P > F	Compostos solúveis	Controle LQC62	P > F
Diâmetro (cm)	6,16	7,00	0,002	2,21	2,32	0,10
AACPCM	15,49	15,29	0,65	5,64	5,82	0,34
Taxa	1,49	1,74	<0,0001	0,51	0,54	0,08

Tabela 3. Avaliação da produção de compostos voláteis por *Clonostachys rosea* (LQC62) e *Trichoderma asperellum* (LQC96) com atividade inibitória à *Botrytis cinerea* e *Myrothecium roridum*, com base no diâmetro final da colônia (Diâmetro), da área abaixo da curva de crescimento micelial (AACPCM) e da taxa de crescimento (Taxa).

	<i>B. cinerea</i>			<i>M. roridum</i>		
	Diâmetro(cm)	AACPCM	Taxa	Diâmetro (cm)	AACPCM	Taxa
Controle	7,04 A ¹	37,45 A	0,75 A	2,73 A	13,74 A	0,31 A
LQC62	2,27 B	13,65 B	0,17 B	1,29 B	6,64 B	0,10 B
LQC96	2,91 B	17,77 B	0,21 B	1,80 AB	9,93 AB	0,15 B
CV (%) ²	16,87	26,49	4,83	12,62	16,85	3,37

¹Médias de tratamentos seguidas pela mesma letra, no sentido a coluna, não diferem entre si (t, $P \leq 0,01$). ²Coeficiente de variação.

Tabela 4. Percentual redução do diâmetro da colônia, percentual de redução da taxa de crescimento e sobreposição das colônias dos antagonistas, *Clonostachys rosea* (LQC62) e *Trichoderma asperellum* (LQC96), pareados com *Myrothecium roridum* (Mr).

	Percentual de redução no diâmetro da colônia	Percentual de redução na taxa de crescimento	Sobreposição de (cm)
LQC96(Mr) ³	26,90 A ¹	32,64 A	0,32 A
Mr(LQC96)	25,74 A	29,23 A	0,0 C
Mr(LQC62)	22,90 A	27,58 A	0,0 C
LQC62(Mr)	16,07 B	14,20 B	0,12 B
CV (%) ²	16,41	18,24	2,78

¹Médias de tratamentos seguidas pela mesma letra, no sentido da coluna, não diferem entre si (t, $P \leq 0,01$). ²Coeficiente de variação. ³Entre parênteses cita-se o fungo ao qual estava pareado o outro a que se faz referência os dados.

Tabela 5. Percentual de redução do diâmetro da colônia, percentual de redução da taxa de crescimento e sobreposição das colônias dos antagonistas, *Clonostachys rosea* (LQC62) e *Trichoderma asperellum* (LQC96), pareados com *Botrytis cinerea* (Bc).

	Percentual de redução no diâmetro da colônia	Percentual de redução na taxa de crescimento	de Sobreposição (cm)
LQC96(Bc) ³	30,73 A ¹	31,42 ^{NS}	0,94 B
Bc(LQC96)	28,00 A	26,62	0,00 C
Bc(LQC62)	27,51 AB	26,76	0,00 C
LQC62(Bc)	21,14 B	22,74	1,98 A
CV (%) ²	16,24	22,57	4,58

¹Médias de tratamentos seguidas pela mesma letra, no sentido da coluna, não diferem entre si (t, $P \leq 0,01$). ²Coeficiente de variação. ³Entre parênteses cita-se o fungo ao qual estava pareado o outro a que se faz referência os dados.

3.2. Antagonismo em discos de folha de begônia de *Clonostachys rosea* e *Trichoderma asperellum* a *Botrytis cinerea* e *Myrothecium roridum*

Ambos os antagonistas foram capazes de colonizar os discos de folhas de begônia, com percentual de área colonizada variando entre 30 e 55% para LQC62, e 11 e 45% para LQC96, dependendo da concentração utilizada. Independentemente da concentração e do momento de dispensa dos antagonistas em relação à inoculação, houve redução na colonização pelos patógenos. Observou-se que, quanto maior o tempo entre a aplicação do antagonista e a inoculação do patógeno, maior foi a redução na colonização do patógeno. As aplicações do antagonista 48h e 24 antes da inoculação do patógeno reduziram em 100% a esporulação dos mesmos (Figura 1). O máximo de redução da colonização dos patógenos ocorreu

com a aplicação dos antagonistas nas concentrações de 1×10^6 e 1×10^7 conídios.ml⁻¹ e nas aplicações simultânea e aplicações dos antagonistas 48 e 24 horas antes da inoculação dos patógenos. *C. rosea* promoveu maior redução da esporulação de ambos patógenos, sendo maior o efeito sobre o crescimento de *B. cinerea* (Figura 2). Foi observado parasitismo de *T. asperellum* sobre os esporodóquios de *M. roridum* (Figura 3).

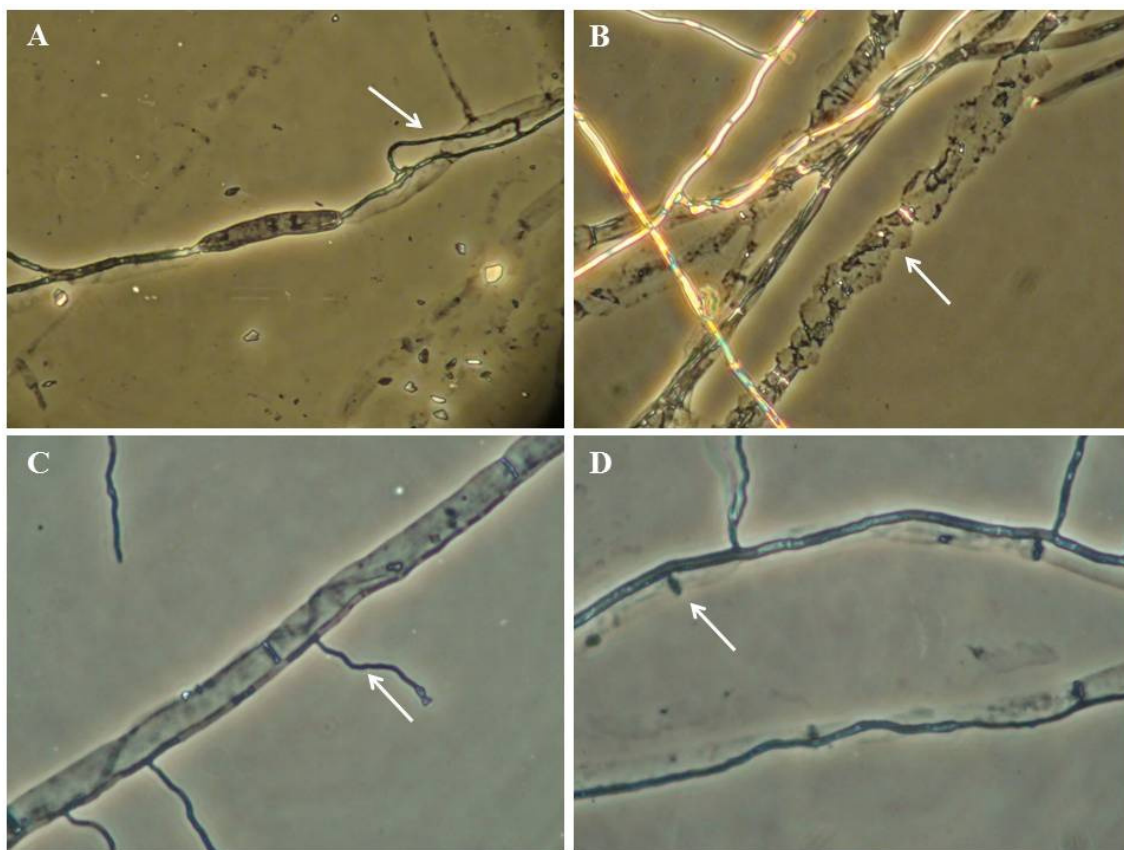


Figura 1. Hifas de *Trichoderma asperellum* LQC96 colonizando hifas de *Botrytis cinerea* (A), resultando em degradação das hifas de *B. cinerea* (B). Hifas de *Clonostachys rosea* LQC62 colonizando hifas de *B. cinerea* (C), com a formação de estruturas do antagonista no interior das hifas de *B. cinerea* (D).

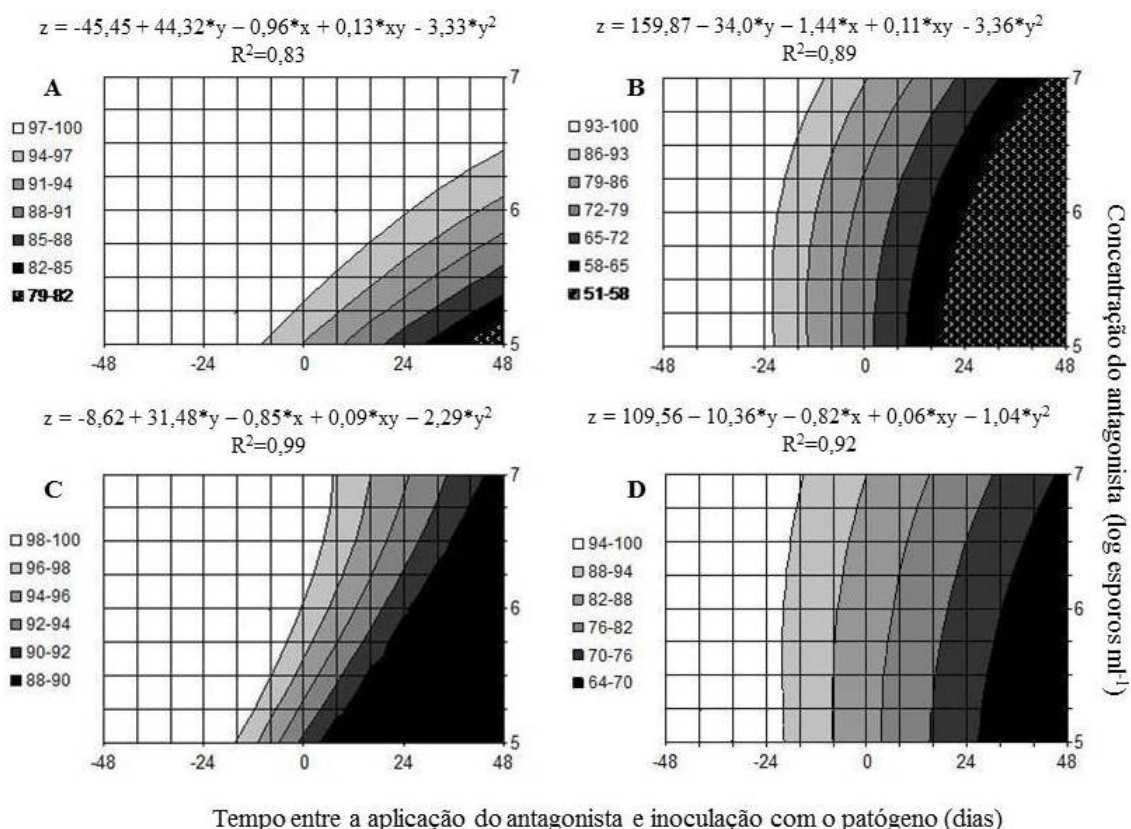


Figura 2. Redução percentual da colonização de discos de folhas de begônia pelos patógenos *Botrytis cinerea* (A,B) e *Myrothecium roridum* (C,D) pela aplicação dos antagonistas *Clonostachys rosea* (A,C) e *Trichoderma asperellum* (B,D), dispensados em diferentes concentrações (1×10^5 , 1×10^6 e 1×10^7 conídios.ml⁻¹) e tempos em relação à inoculação com o patógeno (48h ou 24h antes ou após o patógeno ou simultâneo). *Todos os parâmetros da equação foram significativos (F, $P \leq 0,05$).

3.3. Controle biológico do mofo cinzento e da mancha de Mirotecio em cultivo comercial de begônias

A incidência de mofo cinzento nos ensaios realizados em área comercial foi observada apenas no lote de plantas com início de cultivo nas semanas 19 e 20. Em relação à mancha de Mirotecio, houve incidência em todos os ensaios avaliados. De maneira geral, a incidência média das doenças foi baixa, próximo a 10%.

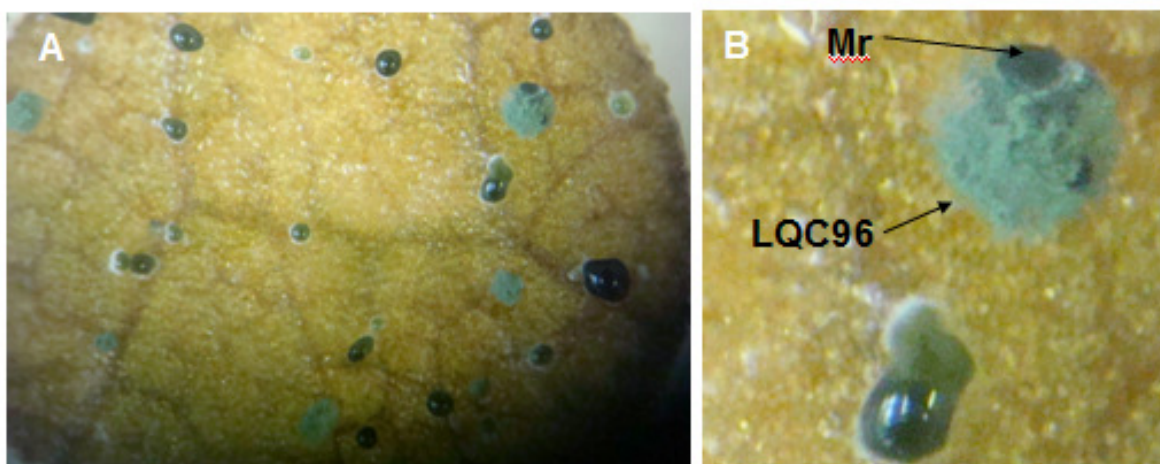


Figura 3. Antagonismo de *Trichoderma asperellum* (LQC96) sobre *Myrothecium roridum* (Mr) em discos de folha de begônia (A), LQC96 parasitando esporodóquio de *M. roridum* (B).

Com relação ao mofo cinzento, pulverizações semanais de LQC62 proporcionaram a menor média de incidência da doença, proporcionando redução na incidência do mofo cinzento comparável ao fungicida padrão (Tabela 6), entretanto, não houve diferença significativa na Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) entre os tratamentos (F, $P=0,31$) (Tabela 6). A aplicação de LQC96 não reduziu a incidência do mofo cinzento e, quando associado à aplicação de fungicidas, também não proporcionou redução da doença (Tabela 6).

Quanto à mancha de Mirotécio, houve uma redução na incidência da doença e na AACPD, quando houve aplicação semanal de LQC62 (Tabela 6). Assim como observado para o mofo cinzento, a aplicação isolada de LQC96 no momento do plantio e quando associado à aplicação de fungicidas, não resultaram na redução da incidência da mancha de Mirotécio.

Tabela 6. Incidência e valores de área abaixo da curva de progresso (AACP) do mofo cinzento e da mancha de Mirotécio em plantas de begônias tratadas com: aplicação de água (controle); Aplicação de tiofanato metílico e hidróxido de cobre (fungicidas), uma aplicação pré plantio de *Trichoderma asperellum* via solo (LQC96) e pulverizações semanais de *Clonostachys rosea* via foliar (LQC62).

	Mofo cinzento		Mancha de Mirotécio	
	Incidência (%)	AACP ^{NS}	Incidência (%)	AACP
Controle	6,66 AB ⁴	34,16	7,77 A	35,00 A
Fungicidas ¹	5,00 B	23,33	4,44 AB	13,88 B
LQC96 ²	11,66 A	54,16	8,33 A	44,72 A
LQC62 ¹	3,33 B	11,66	2,22 B	13,88 B
LQC96 ²	4,16 B	32,08	1,66 B	9,72 B
Fungicidas ¹				
CV (%) ³	36,93	38,18	35,13	35,54

¹Aplicação via foliar. ²Aplicação via solo. ³Coeficiente de variação. ⁴Médias de tratamentos seguidas pela mesma letra, no sentido da coluna, não diferem entre si (t, $P \leq 0,01$). ^{NS} Não significativo. (F, $P = 0,31$).

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi possível observar indícios da produção de compostos voláteis e solúveis pelos antagonistas que tenham propriedades inibitórias contra patógenos foliares de begônia, *B. cinerea* e *M. roridum*.

Compostos voláteis do isolado de *T. asperellum* LQC96 utilizado neste estudo tiveram atividade antimicrobiana para ambos patógenos avaliados. Com relação aos compostos solúveis avaliados em meio com cultivo prévio de *T. asperellum* LQC96 sobre membrana de celofane, demonstrou redução de aproximadamente 80% no desenvolvimento de *B. cinerea*, considerando todas as variáveis analisadas.

Espécies de *Trichoderma* são consideradas eficientes antagonistas contra uma ampla gama de patógenos de planta, atuando por meio da antibiose, produzindo metabólitos voláteis e solúveis (DENNIS; WEBSTER, 1971a; DENNIS; WEBSTER 1971b; CAMPOTOTA, 1985; CLAYDON et al., 1987). Neste gênero, já se relatou a produção de mais de 40 diferentes metabólitos que podem contribuir no micoparasitismo e ter ação antibiótica (SIVASITHAMPARAM; CHISALBERTI, 1998).

Para *B. cinerea*, algumas espécies de *Trichoderma*, como *T. viride*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. polysporum*, *T. koningii* e *T. pseudokoningii* são capazes de produzir compostos voláteis em diferentes condições de temperatura ocasionando a inibição do crescimento deste patógeno (TRONSMO; DENNIS, 1978).

Bélanger et al., (1995), ao estudarem eventos cronológicos associados a propriedades antagônicas de *T. harzianum* contra *B. cinerea*, observaram ação antagônica de compostos solúveis, por meio da produção de substância antibióticas, levando à morte celular, seguido pela degradação da célula por meio de enzimas quitinolíticas. No estudo realizado por Lopes et al., (2012), onde foram obtidas estirpes de *Trichoderma* em cultivos de feijão no Cerrado brasileiro, verificou-se que os isolados de *T. asperellum* apresentaram um alto grau de produção de enzimas degradadoras de parede celular, e exibiram de alta a média atividade específica para enzimas chaves no processo de micoparasitismo. Desta forma, a degradação das hifas de *B. cinerea* por LQC96 observada neste trabalho pode ser resultado de enzimas com estas propriedades.

O isolado LQC62 de *C. rosea* também proporcionou redução no desenvolvimento dos patógenos, tanto pela produção de compostos voláteis, como

também pela produção de compostos solúveis, neste caso, apenas contra *B. cinerea*. Rodríguez et al., (2011) observaram a inibição de *Sclerotinia sclerotiorum* pela produção de metabólitos solúveis por este antagonista, como demonstrado neste trabalho para *B. cinerea*.

No ensaio de cultura pareada foi observada a inibição mútua entre os patógenos e antagonistas estudados era algo esperado, visto que ambos podem produzir metabólitos com atividade inibitória, além da própria competição por nutrientes. A inibição mútua em cultivo pareado já foi observada ocorrendo para isolados de *C. rosea* e fitopatógenos (WHIPPS, 1987; MEJÍA et al., 2008). Entretanto, foi possível verificar a colonização dos patógenos pelos antagonistas, tendo em vista a ocorrência da sobreposição do crescimento destes sobre os patógenos estudados. Li et al., (2002), observaram ultra estruturalmente o micoparasitismo de *C. rosea* em *B. cinerea*, sendo que o antagonista tem a capacidade de penetrar diretamente nas hifas sem que haja a formação do apressório e estudos de microscopia eletrônica indicaram recuo e ruptura das paredes da célula hospedeira em locais de penetração. Os conídios e tubos de germinação de *B. cinerea* parasitados mostraram sinais de desintegração citoplasmática e da presença de hifas do antagonista.

O método de estudo de antagonismos em discos de folhas foi desenvolvido para avaliar microrganismos para o controle do mofo cinzento causados por *B. cinerea* em morango por Peng e Sutton (1990). Os autores verificaram que os dados obtidos em campo correlacionavam significativamente com os ensaios em discos de folha, possibilitando a seleção de isolados de *T. viridae* e *C. rosea* que suprimiam a esporulação de *B. cinerea*. (PENG; SUTTON, 1990; PENG; SUTTON, 1991).

Entretanto, esse efeito pode variar para diferentes hospedeiros (SUTTON et al., 1997)

Nos presente estudo, os antagonistas testados mostraram capacidade de colonizar eficientemente os tecidos foliares de begônia e de reduzir em até 100% a colonização de *B. cinerea* e *M. roridum* quando aplicados preventivamente ou simultaneamente ao patógeno, indicando potencial de controle da doença em cultivo.

A colonização dos discos pelos antagonistas e a redução do crescimento dos patógenos foi diretamente proporcional à concentração de esporos dos antagonistas aplicada, o que indica um efeito de competição entre estes organismos como mecanismo de controle, sendo as concentrações de 1×10^6 e 1×10^7 conídios.ml⁻¹ demonstraram os melhores resultados na redução de *B. cinerea* e *M. roridum*. Morandi et al., (2001) e Morandi et al., (2003) também observaram em isolados de *C. rosea* que, nas concentrações mais elevadas, o antagonista foi mais eficiente na competição com *B. cinerea* em discos de folha de roseira.

Entretanto, Yu e Sutton (1994) verificaram que em concentrações muito elevadas (1×10^8 conídios.ml⁻¹), o estabelecimento e a eficiência de *C. rosea* em framboesa foram prejudicados, aparentemente por autoinibição. Assim, é importante determinar as concentrações dos antagonistas para a aplicação no campo, pois para haver o controle biológico efetivo, deve ter o inóculo suficiente para que o antagonista possa se estabelecer, colonizar os tecidos e inibir o patógeno. Os resultados do presente trabalho indicam que a concentração de 1×10^7 conídios.ml⁻¹ dos antagonistas proporcionam colonização eficiente dos tecidos do hospedeiro e um bom nível de controle dos patógenos.

Nos ensaios de cultivo comercial, as aplicações foliares semanais de LQC62 reduziram efetivamente a incidência de mofo cinzento e mancha de Mirotécio em begônia, corroborando os resultados observados em outras plantas (SUTTON et al., 1997; KÖHL et al., 1998; MORANDI et al., 2003; MORANDI; BETTIOL, 2008; DE WIT; KIEVITSBOSH; BETTIOL, 2009; SILVERA-PÉREZ et al., 2010; CHATTERTON; PUNJA, 2012). O número de aplicações de *C. rosea* necessárias para o biocontrole de *B. cinerea* varia segundo o patossistema e as condições ambientais. Cota, Maffia e Mizubuti, (2008) realizaram ensaios com *C. rosea* em condições de campo para o controle do mofo cinzento em morango, sendo recomendadas pelo menos duas aplicações semanais de *C. rosea* para o programa de manejo do mofo cinzento em morangos. Já em casa de vegetação, a aplicação semanal de *C. rosea* foi suficiente para o manejo da doença em morangueiro (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 1997), da mesma forma que observado para o mofo cinzento em begônias neste estudo.

No caso de aplicação pré plantio LQC96 ao substrato em associação com fungicidas não foi possível observar redução significativa do mofo cinzento em relação a pulverização de fungicidas. Já para a mancha de Mirotécio, foi observada uma redução na incidência da doença quando, além das aplicações de fungicida, realizou-se a aplicação de LQC96 ao solo no momento do plantio. Entre os mecanismos de ação de espécies de *Trichoderma* no manejo de doenças de plantas, estão a habilidade de promover crescimento e desenvolvimento de plantas, bem como a possibilidade de induzir resistência (CHET, 1987; MELO 1991; HOWELL, 2003; HARMAN et al., 2004;). Isto pode justificar o fato de que a

aplicação via solo de *T. asperellum* tenham ocasionado a redução de uma doença ocasionada por um patógeno foliar.

Como não há registro de pesquisas envolvendo controle biológico da mancha de Mirotécio, este trabalho é pioneiro. Os resultados obtidos, tanto em condições controladas quanto em cultivo, indicam que os antagonistas testados possuem potencial para o controle da doença.

Em conclusão, destaca-se que o isolado de *C. rosea* LQC62 foi eficiente no controle das doenças em begônia em condições controladas e em condições de cultivo, sob baixa intensidade de doença. O isolado de *T. asperellum* LQC96, apesar de eficiente nos testes iniciais não foi efetivo em condições de cultivo. Entretanto, há a necessidade de verificar outras formas de aplicação, como por exemplo, variando o intervalo de aplicação e realizar aplicações na parte aérea. Além disso, é importante verificar o comportamento dos agentes de biocontrole em situações de maior intensidade das doenças.

5. REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G.N., **Plant Pathology**, fifth ed. Academic Press, New York. 2005. 922p.
- AGROFIT. Sistema de agrotóxicos fitossanitários.** 2012. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 20 dez. 2012.
- ALEXANDRE, M. A. V.; DUARTE, L. M. L. **Aspectos fitopatológicos de plantas ornamentais.** São Paulo: Instituto Biológico, 2007. p.1-73. (Boletim Técnico, 20).
- ANDREWS, J. H. Biological control in the phyllosphere. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 603-635, 1992.
- BÉLANGER, R. R.; DUFOUR, N.; CARON, J.; BENHAMOU, N. Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: Indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 5, p. 41-54, 1995.
- BENDAHMANE, B. S.; MAHOUT, D.; BENZOHERA, I. E.; BENKADA, M. Y. Antagonism of three *Trichoderma* species against *Botrytis fabae* and *B. cinerea*, the causal agents of chocolate spot of faba bean (*Vicia faba* L.) in Algeria. **World Applied Science Journal**, Dubai, v. 17, n. 3, p. 278-283, 2012.
- CHASE, A. R. *Myrothecium* Leaf Spot of *Begonia*, *Gardenia* Gloxinia and New Guinea Impatiens. In: CHASE, A. R. (Ed.). **Compendium of ornamental foliage plant diseases.** Minnesota: APS Press, 1992. p. 19-20.
- CHATTERTON, S.; PUNJA, Z. K. Colonization of geranium foliage by *Clonostachys rosea* f. *catenulata*, a biological control agent of Botrytis grey mould. **Botany** Ottawa, v.90, p.1-10, 2012.
- CHET, I.; HENIS, Y. Effect of catechol and disodium EDTA on melanin content of hyphal and sclerotial walls of *Sclerotium rolfsii* Sacc. and the role of melanin in the susceptibility of these walls to beta 1,3 glucanase and chitinase. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 1, n. 2, p. 31-38, 1985. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(69\)90003-0](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(69)90003-0)>.
- COTA, L. V.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Brazilian isolates of *Clonostachys rosea*: colonization under different temperature and moisture conditions and temporal dynamics on strawberry leaves. **Letters in Applied Microbiology**, West Sussex, v.46, p. 312–317, 2008.
- DAUGHTREY, M. L.; WICK, R. L.; PETERSON, J. L. **Compendium of flowering potted plant diseases.** Saint Paul: APS Press, 1995. p. 1-2, 11-14, 19-20, 25-28, 39-42, 44-45, 56-57, 61-62.
- DE WIT, J.P., KIEVITSBOSH, R.A., BETTIOL, W., 2009. Integração de métodos físicos e biológicos para o controle de doenças e pragas em lírio e espatifilo, in:

BETTIOL, W., MORANDI, M.A.B., **Biocontrole de doenças de plantas, uso e perspectivas**. Embrapa CNPMA, Jaguariúna pp. 331-336.

DENNIS C, WEBSTER J.. Antagonistic properties of species-group of *Trichoderma* I. Production of non-volatile antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 57, p.25-39, 1971b.

DENNIS, C.; WEBSTER, J., Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II - Production of volatile antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 57, p.41-48, 1971a.

DIANEZ, F.; SANTOS, M.; BLANCO, R.; TELLO, J. C. Fungicide resistance in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry crops in Huelva (southwestern Spain). **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 30, p. 529-534, 2002.

ELAD, Y. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. **Crop Protection**, Oxford, v, 19, p. 709-714, 2000.

ELAD, Y. Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. **European Journal of Plant Pathology**, Oxford, v. 102, n. 8, p. 719-732, 1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/BF01877146>>.

ELAD, Y.; MALATHRAKIS, N. E.; DIK, A. J. Biological control of *Botrytis*-incited diseases and powdery mildews in greenhouse crops. **Crop Protection**, Oxford, v. 15, p. 229-240, 1996.

ELAD, Y.; SHTIENBERG, D. *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables: chemical, cultural, physiological and biological controls and their integration. **Integrated Pest Management Reviews**, Dordrecht, v. 1, n. 1, p. 15-29, 1995.

ELAD, Y.; SHTINBERG, D. *Trichoderma harzianum* T39 (Trichodex) integrated with fungicides for the control of grey mould of strawberry, vegetable greenhouse-crops and grapes. In: WENHUA, T.; COOK, R.S.; ROVIRA, A. (Ed.) **Advances in biological control of plant diseases**. Beijing: China Agricultural University Press, 1996. p. 310-319.

ELAD, Y.; WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, B.; DELEN, N. *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems - an introduction. in: ELAD, Y., WILLIAMSON, B., TUDZYNSKI, B., DELEN, N. (Eds.), **Botrytis: Biology, Pathology and Control**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, pp. 1-8, 2004.

ESKES, A.B., The use of leaf disk inoculations in assessing resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.88, p.127-141, 1982.

FUJINAWA, M. F.; PINTO, Z. V.; VILELA, E. S. D.; PIERMANN, L. Avaliação da atividade celulolítica de agentes de controle biológico. In: V COBRADAN Congresso Brasileiro de Defensivos Agrícolas Naturais, Jaguariúna SP. **Anais do V COBRADAN**, Jaguariúna. p.5, 2011.

FUJINAWA, M. F.; SANTOS, N. F.; PONTES, N. C.; GOES, A.; MORANDI, M. A. B.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Primeiro relato de *Myrothecium* sp. causando mancha foliar em begônia no Brasil. **Tropical Plant Pathology**, Manaus, v. 37, supl., 2012.

GULLINO, M. L. Chemical control of *Botrytis* spp., in: VERHOEFF, K., Malathrakis, N.E., Williamson, E.B. (Ed.) **10th International Botrytis Symposium**. Heraklion, Crete, Greece. Pudoc Scientific Publishers, pp. 217-222, 1992.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Review Microbiology**, London, v. 2, p. 43-56, 2004.

HAUSBECK, M. K.; MOORMAN, G. W. Managing *Botrytis* in greenhouse-grown flower crops. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 80, p. 1211-1219, 1996.

HJELJORD, L. G.; STENSVAND, A.; TRONSMO, A. Effect of temperature and nutrient stress on the capacity of commercial *Trichoderma* products to control *Botrytis cinerea* and *Mucor piriformis* in greenhouse strawberries. **Biological Control**, Orlando, v. 19, p. 149-160, 2000.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, Orlando, v. 87, p. 4-10, 2003.

JARVIS, W. R. **Managing diseases in greenhouse crops**. Harrow: APS Press, 1992. 288 p.

JARVIS, W. R. Managing diseases in greenhouse crops. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 73, p. 190-194, 1989.

JOHNSON, K. B.; SAWYER, T. L.; POWELSON, M. L. Frequency of benzimidazole and dicarboximide resistant strains of *Botrytis cinerea* in western Oregon small fruit and snap bean plantings. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 78, p. 572-577, 1994.

KÖHL, J.; FOKKEMA, N. J. Strategies for biological control of necrotrophic fungal foliar pathogens. In: BOLAND, G. J.; KUYKENDALL, L. D. (Ed.). **Plant-Microbe interactions and biological control**. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 49-88.

KÖHL, J.; GERLAGH, M.; DE HAAS, B. H.; KRIJGER, M. C. Biological control of *Botrytis cinerea* in cyclamen with *Ulocladium atrum* and *Gliocladium roseum* under commercial growing conditions. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, p. 568-575, 1998.

LAMONDIA, J. A.; DOUGLAS, S. M. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from Connecticut greenhouses to benzimidazole and dicarboximide fungicides. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, p. 729-732, 1997.

LARSON, R. A. Begonias. In: _____. (Ed.) **Introduction to floriculture**. New York: Academic Press, 1980. p. 395-340.

LI, G. Q., HUANG, H. C., KOKKO, E. G., ACHARYA, S. N. Ultrastructural study of mycoparasitism of *Gliocladium roseum* on *Botrytis cinerea*. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 43, p. 211-218, 2002.

LOPES, F.A.C.; STEINDORFF, A.S.; GERALDINE, A.M.; BRANDÃO, R.S.; MONTEIRO, V.N.; JÚNIOR, M.L.; COELHO, A.S.G.; ULHOA, C.J.; SILVA, R.N., Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolates from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal Biology**, Article in press, 2012.

MALATHRAKIS, N. E.; KLIRONOMOU, E. J. Control of grey mould of tomatoes in greenhouses with fungicides and antagonists. In: VERHOEFF, K.; MALATHRAKIS, N. E.; WILLIAMSON, B. (Ed.). **Recent advances in Botrytis research**. Wageningen: Pudoc Science, 1992. p. 282-286.

MANGANDI, J. A.; SEIJO, T. E.; PERES, N. A. First Report of *Myrothecium roridum* causing *Myrothecium* leaf spot on *Salvia* spp. in the United States disease report. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, p. 772, 2007.

MELO, I.S.. Potencialidade de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Ed.) **Controle biológico de doenças de plantas**. Embrapa-CNPMA, Jaguariúna, p. 135-156, 1991.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Integração de métodos biocompatíveis no manejo de doenças e pragas: experiência em plantas ornamentais e medicinais. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 33, supl., p. 31-34, 2008.

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

MORANDI, M. A. B.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G.; ALFENAS, A. C.; BARBOSA, J. G.; CRUZ, C. D. Relationships of microclimatic variables to colonization of rose debris by *Botrytis cinerea* and the biocontrol agent *Clonostachys rosea*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 16, p. 619-630, 2006.

MORANDI, M. A. B.; MAFFIA, L. A.; SUTTON, J. C. Development of *Clonostachys rosea* and interactions with *Botrytis cinerea* in rose leaves and residues. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 29, p. 1-11, 2001.

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

MYRESIOTIS, C. K.; KARAOGLANIDIS, G. S.; TZAVELLA-MONARI, K. Resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, hydroxylanilide, benzimidazole, and dicarboximide fungicides. **Plant Disease**, Saint Paul, v, 91, p. 407-413, 2007.

NOBRE, S. A. M.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G.; COTA, L. V.; DIAS, A. P. S. Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. **Biological Control**, Orlando, v. 34, p. 132-143, 2005.

PAK, H. A.; BEEVER, R. E.; LARACY, E. P. Populations dynamics of dicarboximide-resistant strains of *Botrytis cinerea* on grapevine in New Zealand. **Plant Pathology**, Oxford, v. 39, p. 501-509, 1990.

PATEL, J.J., BROWN. Interactions of *Azobacter* with rhisophere and root-surface microflora. **Plant and Soil**, 31, 273-281, 1969.

PAULITZ, T. C. Population dynamics of biocontrol agents and pathogens in soils and rhizospheres. **European Journal of Plant Pathology**, Oxford, v. 106, p. 401-413, 2000.

PAULITZ, T. C.; BÉLANGER, R. R. Biological control in greenhouse systems. **Annual Review Phytopathology**, v. 39, p. 103-133, 2001.

PENG, G.; SUTTON, J. C. Biological methods to control grey mould of strawberry. **Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases**, Alton, v. 1, p. 233-240, 1990.

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

PIMENTEL-GOMES, F.; GARCIA, C.H. **Estatística aplicada a experimentos agrônômicos e florestais**. Fealq, Piracicaba, p.309, 2002.

QUEZADO-DUVAL, A. M.; HENZ, G. P.; PAZ-LIMA, M. L.; MEDEIROS, A. R.; MIRANDA, B. E. C.; PFENNING, L. H.; REIS, A. New hosts of *Myrothecium* spp. in Brazil and a preliminary in vitro assay of fungicides. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 41, p. 246-252, 2010.

REYNOLDS, D.; DEVRIES, D.; CARNEY, L. Begonia. In: BALL, V. (Ed.). **Ball red book**. Batavia: Ball Publishing, 1998. p. 388-395.

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

SILVERA-PÉREZ, A. E.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; DUARTE, V.; SANTOS, H. P.; FELIPPETO, J. Controle do mofo cinzento com *Clonostachys rosea* na produção de mudas de fúcsia. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 35, p. 163-169, 2010.

SIVASITHAMPARAM, K.; CHISALBERTI, E. L. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: KUBICEK C. P.; HARMAN, G. E. (Ed.). **Trichoderma and Gliocladium**. London: Taylor & Francis, 1998. p. 139-191.

SUTTON, J. C.; LI, D. W.; PENG, G.; YU, H.; ZHANG, P.; VALDEBENITO-SANHUENZA, R. M. *Gliocladium roseum* : a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, p. 316-328, 1997.

TATAGIBA, J.S., MAFFIA, L.A., BARRETO, R.W., ALFENAS, A.C., SUTTON, J.C. Biological control of *Botrytis cinerea* in residues and flowers of rose (*Rosa hybrida*) **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 26, p. 8-19, 1998.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; SUTTON, J. C.; PERAZZOLO, I.; CZERMAINSKI, A. B. C. Controle biológico de *Botrytis cinerea* em morangueiros cultivados em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 69-73, 1997.

WILLIAMSON, B., TUDZYNSKI, B., TUDZYNSKI, P., VAN KAN, J. A. L. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. **Molecular Plant Pathology**, West Sussex, v.8, p.561–580, 2007.

YOURMAN, L. F.; JEFFERS, S. N. Resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, p. 569-575, 1999.

YU, H.; SUTTON, J. C. Effectiveness of bumblebees and honeybees for delivering inoculum of *Gliocladium roseum* to raspberry flowers to control *Botrytis cinerea*. **Biological Control**, Orlando, v. 10, p. 113-122, 1997.

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

ZIMAND, G.; ELAD, Y.; CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, p. 1255-1260, 1996.

CAPÍTULO 3 - PODRIDÃO DO COLO CAUSADA POR *Fusarium* sp. EM BEGÔNIA: ETIOLOGIA E CONTROLE BIOLÓGICO POR *Clonostachys rosea* LQC62 E *Trichoderma asperellum* LQC96

RESUMO – O patossistema envolvendo *Fusarium* sp. são consideradas doenças problemáticas e de difícil controle. Não há uma medida simples e única que seja eficaz para o seu controle, sendo necessária a adoção de várias estratégias. Dentre elas, o controle biológico utilizando microrganismos antagonistas tem despertado atenção, porém pouco se sabe sobre a sua eficiência em begônias, especialmente no Brasil. O trabalho teve como objetivo inicial estudos quanto a etiologia da podridão do colo, e estudos de controle biológico mediante emprego do antagonismo dos isolados LQC62 de *Clonostachys rosea* e LQC96 de *Trichoderma asperellum*. Para tal foram avaliados os mecanismos de ação direta sobre o patógeno, assim como quanto à colonização e supressão da esporulação em hastes de begônia, e o controle da podridão do colo em cultivo comercial. Constatou-se inibição do patógeno por compostos solúveis e voláteis produzidos pelos antagonistas. Ambos os antagonistas foram capazes de colonizar hastes de begônia, sendo que LQC62 demonstrou ser eficiente na supressão da esporulação de *Fusarium* sp. em hastes de begônia nos tratamentos testados, enquanto que LQC96 apresentou eficiência apenas nos tratamentos preventivos. Nos ensaios em casa de vegetação, os tratamentos com LQC62 apresentaram os melhores resultados, seguidos dos tratamentos com LQC96. Concluiu-se que ambos os agentes de controle foram eficientes no manejo da podridão do colo em begônia. Estudos adicionais relativos à etiologia da doença fazem-se necessários.

Palavras chaves: *Begonia elatior*, *Clonostachys rosea*, *Fusarium* sp., Fator de alongação 1 α , ITS, *Trichoderma asperellum*.

CHAPTER 3 - COLLAR ROT CAUSED BY *Fusarium* sp. IN BEGONIA: ETIOLOGY AND BIOLOGICAL CONTROL WITH *Clonostachys rosea* LQC62 AND *Trichoderma asperellum* LQC96

ABSTRACT – *Fusarium* disease is considered one of the most problematic and difficult to control. There is not a simple or unique measure that is effective for its control. For the control of this disease are adopted various phytosanitary measures. One measure that has attracted attention is the biological control using antagonistic microorganisms, but little is known about the efficiency of these biocontrol agents in begonias in Brazil. The initial study aimed to studies on the etiology of collar rot and to evaluate their potential biological control, the antagonism was assessed in *Clonostachys rosea* isolated LQC62 and *Trichoderma asperellum* isolated LQC96, evaluating the mechanisms of action on this pathogen colonization and suppression of sporulation rods begonia and control of stem rot in commercial cultivation. There was inhibition by soluble and volatile compounds produced by the antagonists against the pathogen. Both antagonists were able to colonize begonia rods and LQC62 shown to be effective in suppression of sporulation of *Fusarium* sp. on stems of begonia in all treatments while LQC96 was efficient only for preventive treatments. In greenhouse tests, treatments with LQC62 showed the best results followed by treatment with LQC96, concluding that both were effective in the management of fusariosis in begonia. More studies are needed to the etiology of collar rot in begonia.

Keywords: *Begonia elatior*, *Clonostachys rosea*, *Fusarium* sp., *Trichoderma asperellum*,

1. INTRODUÇÃO

A produção e o consumo de plantas ornamentais no Brasil têm crescido e diversificado nos últimos anos, tanto em termos de volume, quanto à diversidade de espécies cultivadas, com consequente incorporação de novos produtores e regiões produtoras (JUNQUEIRA; PEETZ, 2008). As flores cultivadas em vaso são responsáveis por aproximadamente 50% da cadeia produtiva de flores, sendo a begônia (*Begonia elatior* Hort. ex Steud - Begoniaceae) uma das principais flores em vaso cultivada e comercializada no Brasil. A produção ocorre em casas de vegetação durante todo o ano, com picos nas épocas festivas como Dia Internacional da Mulher, Dia das Mães, Dia dos Namorados, Finados, Natal e Ano Novo. Dentre as suas qualidades e apreciação destacam-se a diversidade de cores das inflorescências, assim como sua beleza e longevidade (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FLORES, 2007).

No Brasil, nos últimos anos têm-se observado perdas significativas de plantas resultantes de uma doença caracterizada por podridão do colo em cultivos de begônia. Tais sintomas foram associados à ocorrência de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl (FUJINAWA et al., 2012a) e também por *Fusarium* sp. (FUJINAWA et al., 2012b). Em termos mundiais a literatura tem correlacionado estes sintomas à infecção por *Fusarium* spp. (DAUGHTREY et al. 1995; SCHROERS et al. 2004). E dentre as espécies associadas destacam-se *F. begoniae* (Nirenberg and O'Donnell) [sin. = *Fusarium sacchari* (Butler) W. Gams var. *elongatum*] e *F. foetens* (NIRENBERG; O'DONNELL, 1998; CAVAT, 1993; SCHROERS et al., 2004). O *F. foetens*, em particular, incita os sintomas de podridão basal em hastes, lesões do tipo anasarca, nervuras foliares amareladas, seguidas de murcha e morte da planta (ELMER; VOSSBRINCK, 2004; SCHROERS et al., 2004; BRAND; WIENBERG, 2005; ELMER et al., 2008), enquanto *F. begoniae* ocasiona queima em flores, folhas e haste (DE GRUYTER et al., 1994), listras transversais marrons necróticas sobre as nervuras, caules e folhas e flores (BLIND et al., 1995). Além desses causa ainda podridão seca e cancro em hastes de begônias os quais não estão associados com dano na raiz ou a descoloração vascular (ELMER, 2008). No Brasil não há literatura relativa ao patossistema envolvendo Begônia-*Fusarium* spp.

O controle de *Fusarium*, independente do patossistema mostra-se muito difícil e complexo. Não há nenhuma medida isolada e eficiente, economicamente eficiente e de proteção duradoura. Aparentemente não há variedades de begônia resistentes ao patógeno. Dentre as medidas de controle recomendadas incluem-se aquelas que apenas minimizam as perdas, e baseiam-se em sanitização como limpeza de mesas, bancadas, ferramentas e maquinários, rouging, eliminação e destruição de restos culturais, emprego de mudas sadias, manejo adequado do ambiente, emprego de substrato livre do patógeno e adoção de boa drenagem (O'NEILL et al., 2000; GULLINO E GARIBALDI, 2007).

Em diversas espécies de plantas ornamentais cultivadas em vaso, o controle biológico tem sido utilizado como parte do manejo de doenças incitadas por espécies de *Fusarium* (LOCKE et al. 1985; SOMEYA et al., 2000; ELMER 2001; MINUTO et al., 2002; ELMER; MCGOVERN 2004). Espécies de *Trichoderma* e *Clonostachys* têm demonstrado eficiência no controle de patógenos do solo em diversas culturas ornamentais e em hortaliças em cultivos protegidos (MCQUILKEN et al., 2001; PAULITZ; BÉLANGER, 2001). Porém, desconhecem-se os aspectos básicos envolvidos no controle biológico da podridão do colo ocasionada por *Fusarium* sp. em begônia.

Sendo assim, o presente trabalho tem por objetivo identificar a espécie de *Fusarium* que associada à podridão do colo em begônia, no Brasil, bem como avaliar o antagonismo de *C. rosea* isolado LQC62 e *T. asperellum* isolado LQC96 ao patógeno, tanto in vitro como em condições normais de cultivo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Isolamento do agente causal da podridão do colo da begônia e obtenção de isolados de fungos antagonistas

O isolado do patógeno foi obtido de plantas doentes coletadas no município de Jacareí, São Paulo, Brasil (23°15'58.45"S e 46° 2'32.24"O). Após o isolamento, avaliou-se a patogenicidade, na qual o isolado obtido foi inoculado com auxílio de um palito de dente previamente infestado, seguido da sua introdução em hastes de

plantas sadias de begônia, mantidas em câmara úmida. Posteriormente realizou-se a identificação do patógeno tomando como referência caracteres morfológicos observados em microscópio de luz e caracterização molecular, por meio da amplificação das regiões ITS e fator de alongação 1- α . Os procedimentos de extração de DNA amplificação das regiões e sequenciamento foram realizados semelhante ao descrito por Fujinawa et al., (2012a). As sequências foram comparadas com sequências encontradas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando o programa BlastN.

Os isolados dos antagonistas avaliados, *C. rosea* e *T. asperellum*, pertencem à coleção do LQC (Laboratório de Quarentena Costa Lima) da Embrapa Meio Ambiente, em Jaguariúna, São Paulo, Brasil e foram selecionados com base em estudos preliminares de antagonismo a outros fitopatógenos. Assim, optou-se pelos isolados LQC62 de *C. rosea*, obtido de cultivos de roseiras, e LQC96 de *T. asperellum*, isolado de amostras de solo cultivado com feijão.

Os isolados foram preservados pelo método de Castellani e em papel de filtro mantido em frascos contendo sílica gel. Para o patógeno, além desses métodos de preservação, realizou-se a herborização de plantas de begônia com sintomas e sinais típicos do patógeno. Amostra do material foi mantido no herbário da Coleção de Referência Micológica da Universidade de Brasília.

2.2. Avaliação da produção de compostos solúveis pelos antagonistas

A avaliação de compostos solúveis foi realizada por meio de duas metodologias: para LQC96 empregou-se o método do papel celofane (GIBBS, 1967), enquanto para LQC62 empregou-se a metodologia de filtrado da cultura líquida.. A metodologia do papel celofane mostra-se ineficiente para o isolado de *C. rosea* porque este apresenta atividade celulolítica, degradando assim o celofane (FUJINAWA et al., 2011).

O método do papel celofane consiste na transferência de um disco de colônia do antagonista para o centro de placas de Petri contendo meio BDA, sobreposto por papel celofane lavado e esterilizado, utilizado normalmente para avaliar a produção de metabólitos voláteis. A cultura foi incubada por 48 horas a 25 $\pm$ 2 °C, com

fotoperíodo de 12 horas. Após esse período removeu-se o papel celofane juntamente com a colônia de LQC96 e depositou-se disco da colônia do patógeno ao centro da placa de Petri. As testemunhas consistiram do cultivo do patógeno em placas onde não se cultivou LQC96 sobre o celofane. Todas as culturas foram incubadas a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 horas.

O método de filtrado da cultura líquida consiste no cultivo de *C. rosea* LQC62 em meio BD (Batata-Dextrose) durante uma semana, sob agitação contínua. A cultura líquida foi filtrada com membrana para filtro microbiológico (Millipore®) de 0,02µm, e o filtrado obtido foi adicionado em meio BDA fundente na concentração de 20% (v/v). A mistura foi vertida para placas de Petri, onde foi colocado um disco da colônia do patógeno. As testemunhas consistiram no cultivo do patógeno no meio BDA sem a adição do filtrado.

Os ensaios foram conduzidos no delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos (LQC96-*Fusarium* sp., LQC62- *Fusarium* sp., testemunha- *Fusarium* sp.), com dez repetições para cada tratamento. Cada unidade amostral foi representada por uma placa.

As avaliações consistiram na determinação do crescimento micelial diário até que nas testemunhas as colônias atingissem os bordos da placa (Bendahmane et al., 2012). As variáveis avaliadas foram o diâmetro da colônia, a área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) e a taxa de crescimento da colônia.

Os ensaios foram conduzidos no delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos (LQC96-*Fusarium* sp., LQC62- *Fusarium* sp., testemunha-*Fusarium* sp.), com dez repetições para cada tratamento.

2.3. Avaliação da produção de compostos voláteis pelos antagonistas

Adotou-se o método descrito por Dick; Hutchinson (1966), citado por Mariano (1993), que consiste em posicionar dois fundos de placas de Petri sobrepostas, contendo em cada uma, cultura do antagonista e do patógeno, seguido da sua selagem com Parafilm®. As culturas foram incubadas em temperatura ambiente, por sete dias, sob luz fluorescente contínua. No caso da testemunha, semeou-se o patógeno em ambas placas. Comparou-se o desenvolvimento do

patógeno exposto aos antagonistas em relação ao crescimento no tratamento controle, medindo-se o tamanho diário da colônia dos patógenos. As variáveis avaliadas foram o diâmetro final da colônia, a área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) e a taxa de crescimento da colônia (cm.dia^{-1}).

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, contendo seis tratamentos (LQC96- *Fusarium* sp., LQC62- *Fusarium* sp., LQC96-LQC96, LQC62-LQC62, *Fusarium* sp.- *Fusarium* sp., *Fusarium* sp. em uma das placas), com cinco repetições para cada tratamento. Cada unidade amostral foi representada por uma placa.

2.4. Culturas pareadas

Para avaliar o antagonismo por meio do hiperparasitismo, utilizou-se o método de culturas pareadas entre patógeno e antagonista, seguindo a metodologia modificada de Patel e Brown (1969). Foram colocados discos de 0,5 cm de diâmetro da colônia do patógeno e do antagonista, colocadas a 6,5cm de distância entre eles, em placas de Petri contendo meio BDA. As testemunhas consistiram na adição de apenas o disco da colônia do patógeno ou do antagonista, em uma das extremidades de cada placa.

Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos e dez repetições para cada tratamento. Cada unidade amostral foi representada por uma placa de Petri. A avaliação foi realizada medindo-se diariamente o tamanho das colônias fúngicas, até que as colônias do patógeno e do antagonista se encontrassem. A partir deste momento, avaliou-se a sobreposição de uma colônia sobre a outra até que as colônias das testemunhas colonizassem toda a placa. Determinou-se a redução no diâmetro da colônia e redução na taxa de crescimento, tanto do patógeno como do antagonista em relação ao tratamento controle, tendo-se por base o tempo de encontro entre as colônias..

2.5. Colonização dos antagonistas e supressão da esporulação do patógeno em hastes de begônia

Para o ensaio da colonização em hastes de begônia pelos antagonistas e o seu efeito sobre os patógenos foram utilizadas caixas plásticas do tipo Gerbox®, previamente desinfestadas. Em cada caixa foi inicialmente adicionada água destilada esterilizada, seguido de deposição de uma tela metálica, sobre a qual depositaram-se 50 hastes de 1 cm de begônia da cultivar Baladin, previamente desinfestados e autoclavados. Após a disposição das hastes nas caixas, realizou-se a inoculação do antagonista e patógeno.

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, contendo com cinco repetições. Cada unidade amostral foi representada por dez discos por placa. Os antagonistas foram avaliadas em três concentrações: 1×10^5 , 1×10^6 e 1×10^7 conídios.mL⁻¹, aplicados a 48, 24 e Zero horas antes do patógeno, e 48 e 24 horas depois do patógeno. O patógeno foi avaliado à concentração de 1×10^5 conídios.mL⁻¹. Após as inoculações, os discos foram mantidos por 24 horas nas caixas de plástico, sendo em seguida transferidos para meio PCA (Paraquat-Choramphenicol-Ágar). As testemunhas consistiram na pulverização apenas de: i) água destilada esterilizada, ii) apenas suspensão do patógeno na concentração de 1×10^5 conídios.mL⁻¹ e, iii) apenas suspensão do antagonista nas três concentrações mencionadas. A avaliação baseou-se na determinação da presença do patógeno e do antagonista nas hastes de begônia colonizadas no décimo dia após a inoculação.

2.6. Controle biológico da podridão do colo por *Fusarium* sp. em cultivo comercial de begônias

Nesse estudo a aplicação dos antagonistas deu-se mediante sua incorporação às práticas de manejo fitossanitário adotadas em uma produção comercial. Empregou-se área de 4 ha em cultivo protegido, com sistema de fertirrigação, localizada no município de Jacareí (São Paulo, Brasil). O manejo da irrigação, nutrição mineral e controle de pragas foram realizados conforme as estratégias adotadas pelo produtor.

Foram realizados quatro ensaios. O primeiro ensaio consistiu no emprego de quatro ciclos de produção, cujos experimentos foram conduzidos em cultivos de mini-begônias (pote 11) das variedades Borias e Baladin a partir das semanas 19,

20, 21, 22, as quais se referem às semanas dos dias, 09, 16, 23 e 30 de maio de 2011, respectivamente. Nestas semanas foram avaliados cinco tratamentos: i) testemunha não tratada (pulverizada apenas com água destilada); ii) tratamento padrão do produtor, com aplicação no plantio, na sexta semana juntamente com tiofanato metílico (Cercobin® 700 WP, Iharabras S.A. Indústria Químicas) e na décima segunda semana com hidróxido de cobre (Kocide® WDG, Du Pont do Brasil S.A.); iii) aplicação única de LQC96 no substrato, antes do plantio via solo com suspensão 1×10^7 conídios.mL⁻¹; iv) aplicações foliares semanais de LQC62 a 1×10^7 conídios.mL⁻¹ e; v) aplicação de LQC96 pré-plantio, no substrato, seguida do tratamento padrão adotado pelo produtor. Optou-se pela dispensa de *T. asperellum* via solo por ser uma prática já adotada na propriedade.

O segundo ensaio consistiu em dois ciclos de produção, iniciados nas semanas 31 e 32, correspondente a 1 e 8 de agosto de 2011, respectivamente, em cultivos de begônias pote 11 da variedade Veronica. Neste ensaio foram testados seis tratamentos: i) testemunha não tratada (pulverizada apenas com água destilada); ii) tratamento padrão do produtor, com aplicação de tiofanato metílico (Cercobin® 700 WP, Iharabras S.A. Indústria Químicas) no plantio e na sexta semana, e aplicação de hidróxido de cobre (Kocide® WDG, Du Pont do Brasil S.A.) na décima segunda semana; iii) aplicações semanais de LQC62 (1×10^7 conídios.mL⁻¹), de forma foliar e no substrato, juntamente com o tratamento padrão do produtor; iv) idem anterior, porém sendo empregado o isolado LQC96 a 1×10^7 conídios.mL⁻¹; v) aplicações semanais de LQC62 a 1×10^7 conídios.mL⁻¹, de forma foliar e no substrato e; vi) aplicações semanais de LQC96 a 1×10^7 conídios.mL⁻¹, de forma foliar e no substrato.

O terceiro ensaio consistiu em apenas um ciclo de produção, iniciado na semana 35 (29 de agosto de 2011) em cultivos de begônias pote 11 das variedades Borias e Baladin. Neste experimento foram avaliados cinco tratamentos: i) testemunha não tratada (pulverizada apenas com água destilada), ii) tratamento padrão do produtor, com aplicação de tiofanato metílico (Cercobin® 700 WP, Iharabras S.A. Indústria Químicas) no plantio e na sexta semana, e aplicação de hidróxido de cobre (Kocide® WDG, Du Pont do Brasil S.A.) na décima segunda semana; iii) aplicações semanais de LQC62 (1×10^7 conídios.mL⁻¹), de forma foliar e

no substrato; iv) aplicações semanais de LQC96 (1×10^7 conídios.mL⁻¹), de forma foliar e no substrato e; v) aplicações foliares semanais de LQC62 (1×10^7 conídios.mL⁻¹) e no substrato, também semanais, de LQC96 (1×10^7 conídios.mL⁻¹).

O quarto ensaio consistiu em apenas um ciclo de produção, iniciado na semana 38 (12 de setembro de 2011), em cultivos de begônias pote 11 da variedade Borias. Este ensaio consistiu de oito tratamentos, sendo: i) testemunha não tratada (pulverizada apenas com água destilada); ii) tratamento padrão do produtor, com aplicação de tiofanato metílico (Cercobin® 700 WP, Iharabras S.A. Indústria Químicas) no plantio e na sexta semana, e aplicação de hidróxido de cobre (Kocide® WDG, Du Pont do Brasil S.A.) na décima segunda semana; iii) aplicações semanais LQC62 (1×10^7 conídios.mL⁻¹), de forma foliar e no substrato, juntamente com o tratamento padrão; iv) idem anterior, porém com o isolado LQC96 (1×10^7 conídios.mL⁻¹); v) aplicações foliares e no substrato semanais de LQC62 (1×10^7 conídios.mL⁻¹), vi) aplicações semanais de LQC96 (1×10^7 conídios.mL⁻¹), de forma foliar e no substrato; vii) aplicações semanais foliares de LQC96 (1×10^7 conídios.mL⁻¹) e no substrato, igualmente semanal, com LQC62 (1×10^7 conídios.mL⁻¹) e; viii) aplicações semanais foliares de LQC62 (1×10^7 conídios.mL⁻¹) e no substrato, de forma semanal, de LQC96 (1×10^7 conídios.mL⁻¹).

Empregou-se o delineamento de blocos ao acaso, com seis repetições para cada tratamento. Cada unidade amostral foi representada por dez vasos. Foram realizadas avaliações semanais durante as 18 semanas do ciclo de cultivo, observando-se a ocorrência natural de sintomas da podridão do colo por *Fusarium* sp. Os tratamentos foram comparados com base na incidência final de plantas sintomáticas e nos valores de área abaixo da curva de progresso das doenças (AACPD).

2.7. Análises estatísticas

As análises foram realizadas utilizando-se os procedimentos UNIVARIATE e GLM no programa SAS 9.1 (SAS Institute, Cary, N.C., USA). Foi feita a análise de variância (ANOVA) e, quando observado efeito significativo dos tratamentos (F, $P \leq 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste t de Student (t, $P \leq 0,05$). Nos casos

onde os fatores avaliados apresentavam níveis quantitativos foram realizados análise de regressão para os fatores que apresentaram efeito significativo (F , $P \leq 0,05$). Todos os experimentos foram repetidos, no mínimo, duas vezes. Nestes casos, realizou-se análise conjunta dos ensaios conforme recomendações descritas por Pimentel-Gomes e Garcia (2002).

3. RESULTADOS

3.1. Obtenção e identificação do agente causal da podridão do colo da begônia

Foi obtido isolado de *Fusarium* sp. frequentemente associado aos sintomas da podridão do colo de begônia. Tal isolado quando inoculado em plantas sadias confirmou a sua patogenicidade, completando-se o Postulado de Koch. Tal isolado, identificado como LQC153 encontra-se depositado na coleção do Laboratório de Quarentena Costa Lima, em Jaguariúna/SP.

Quando analisadas suas características morfológicas, o isolado obtido apresentou monofiálides curtas e macroconídios com predominância de 3-5 septos. O formato dos microconídios variou de ovais a fusiforme, com 0-1 septo. Houve produção de clamidósporos, em grupos e solitários. A coloração apresentou-se branca, como os microconídios produzidos em falsas cabeças. A coloração das colônias vistas no verso das placas mostrava-se salmão a violeta. Estas características culturais e morfológicas enquadram-se em *Fusarium oxysporum*, conforme descrito por Leslie; Summerell (2006), e difere de *F. begoniae* devido à presença de clamidósporos (NIRENBERG; O'DONNELL, 1998).

Com base na análise da região ITS pelo Programa BlastN, observou-se 99% de similaridade com isolados de *F. oxysporum*. Entretanto, na análise da região do fator de alongação 1-alfa, houve maior similaridade (100%) com isolados de *F. foetens*. Desta forma, com as análises efetuadas, não foi possível chegar a uma identificação precisa da espécie de *Fusarium* associada aos sintomas de podridão do colo.

3.2. Avaliação da produção de metabólitos solúveis e voláteis e do hiperparasitismo de *Clonostachys rosea* e *Trichoderma asperellum* a *Fusarium* sp.

Foi verificado que compostos solúveis de *C. rosea* LQC62 reduziram o desenvolvimento de *Fusarium* sp., com redução significativa (F, $P \leq 0,0001$) do diâmetro da colônia, da AACPCM e da taxa de progresso do crescimento da colônia em relação à testemunha. No entanto, não houve efeito significativo (F, $P \leq 0,05$) de *T. asperellum* LQC96 sobre *Fusarium* sp. quanto às variáveis diâmetro da colônia, AACPCM e taxa de progresso do crescimento da colônia (Tabela 1).

Ambos antagonistas produziram compostos voláteis com atividade inibitória contra *Fusarium* sp., sendo observada redução no crescimento das colônias em relação a todas as variáveis avaliadas (Tabela 2). O efeito inibitório causado pelos compostos voláteis de LQC62 e LQC96 atuaram de forma semelhante sobre o patógeno, apresentando inibição de cerca de 36% e 39% no diâmetro, 35% e 34% na AACPCM e 34% e 49% na taxa de crescimento micelial, respectivamente.

Tabela. 1. Inibição do crescimento *in vitro* de *Fusarium* sp. pela produção de compostos solúveis em meio de cultura por *Clonostachys rosea* LQC62 e *Trichoderma asperellum* LQC96, estimada com base no diâmetro final da colônia (Diâmetro), da área abaixo da curva de crescimento micelial (AACPCM) e da taxa de crescimento (Taxa).

Variáveis	Isolado LQC62			Isolado LQC96		
	Controle	Compostos solúveis	P > F	Controle	Compostos solúveis	P > F
Diâmetro (cm)	7,28	5,41	<0,0001	7,67	7,55	0,07
AACPCM	17,99	13,98	<0,0001	22,82	22,85	0,45
Taxa	0,90	0,61	<0,0001	1,25	1,25	0,41

Tabela 2. Avaliação da produção de compostos voláteis por *Clonostachys rosea* LQC62 e *Trichoderma asperellum* LQC96 com atividade inibitória a *Fusarium* sp., com base no diâmetro final da colônia (Diâmetro), da área abaixo da curva de crescimento micelial (AACPCM) e da taxa de crescimento (Taxa).

Isolados	<i>Fusarium</i> sp.		
	Diâmetro da colônia (cm)	AACPCM	Taxa
Controle	6,14 A	26,18 A	0,79 A
LQC96	3,93 B	16,96 B	0,52 B
LQC62	3,71 B	17,30 B	0,40 B
CV (%) ²	8,07	22,69	10,24

¹Médias de tratamentos seguidas pela mesma letra, no sentido a coluna, não diferem entre si (t, $P \leq 0,01$). ²Coeficiente de variação.

No cultivo pareado, verificou-se que o encontro das colônias deu-se no quarto dia para LQC96, e no oitavo dia para o LQC62 (Figura 1). Após esse evento, houve a paralisação do crescimento do patógeno e dos antagonistas, resultando na sobreposição média de 1,20 cm e 1,12 cm para LQC96 e LQC62, respectivamente, demonstrando capacidade hiperparasítica nesta interação (Figura 2).

No pareamento com LQC96 observou-se a redução da velocidade de crescimento do antagonista e do patógeno quando comparados com a testemunha. Porém no pareamento com LQC62, a velocidade de crescimento do antagonista manteve-se o mesmo, com ou sem pareamento.

3.3. Antagonismo em hastes de begônia de *Clonostachys rosea* e *Trichoderma asperellum* a *Fusarium* sp.

Ambos os antagonistas, LQC96 e LQC62, foram eficientes na colonização das hastes de begônia (Figura 3). O isolado LQC62 mostrou-se eficiente na inibição da colonização de hastes de begônia por *Fusarium* sp. em todos os tratamentos (dispensa do antagonista 48 e 24 horas antes da aplicação do patógeno; aplicação simultânea e dispensa do antagonista 48 e 24 horas depois do patógeno), independente da concentração de inóculo avaliada. Por outro lado, o isolado LQC96

apresentou eficiência apenas nos tratamentos preventivos, com aplicação 48 e 24 horas antes do patógeno, nas três concentrações testadas. Desta forma, aplicação de LQC62 demonstrou maior eficiência que LQC96.

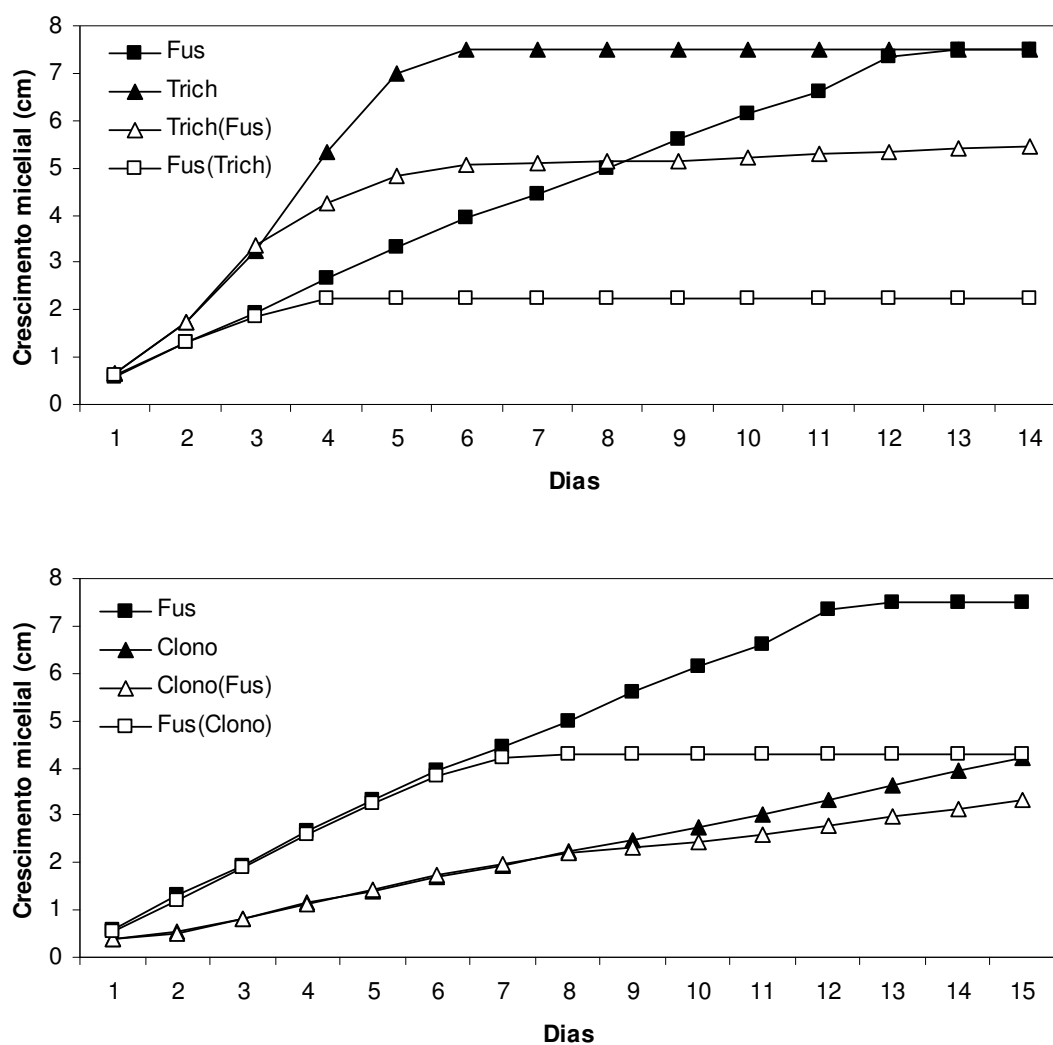


Figura 1. Crescimento micelial (cm) em culturas pareadas de *Clonostachys rosea* LQC62 (A) e *Trichoderma asperellum* LQC96 (B) com *Fusarium* sp.

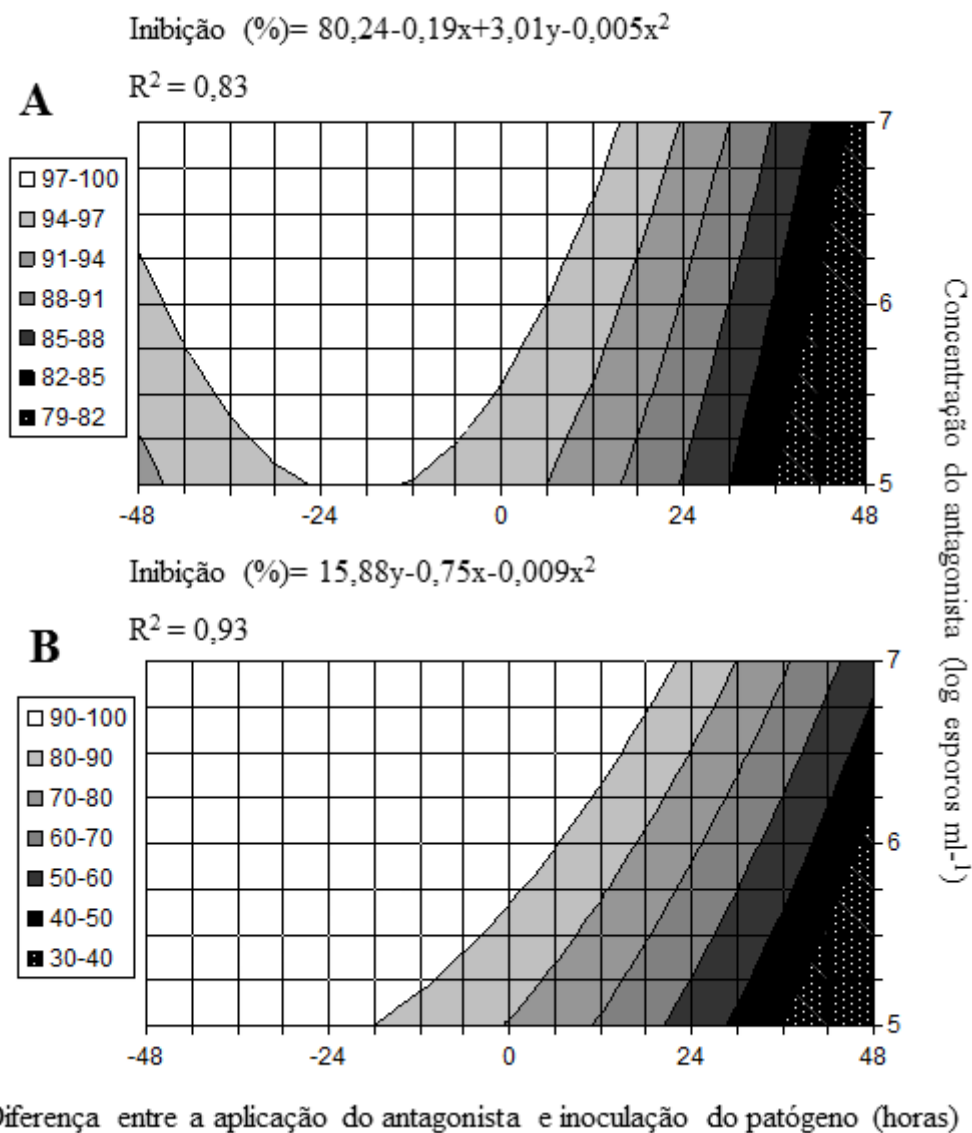


Figura 2. Redução (em %) da colonização de hastes de begônia pelo patógeno *Fusarium* sp. pela aplicação dos antagonistas *Clonostachys rosea* (A) e *Trichoderma asperellum* (B) em diferentes concentrações (1×10^5 , 1×10^6 e 1×10^7 conídios.mL⁻¹) e tempos em relação à inoculação com o patógeno (48h, 24h antes ou após o patógeno ou simultâneo). *Todos os parâmetros da equação foram significativos (F, $P \leq 0,05$).

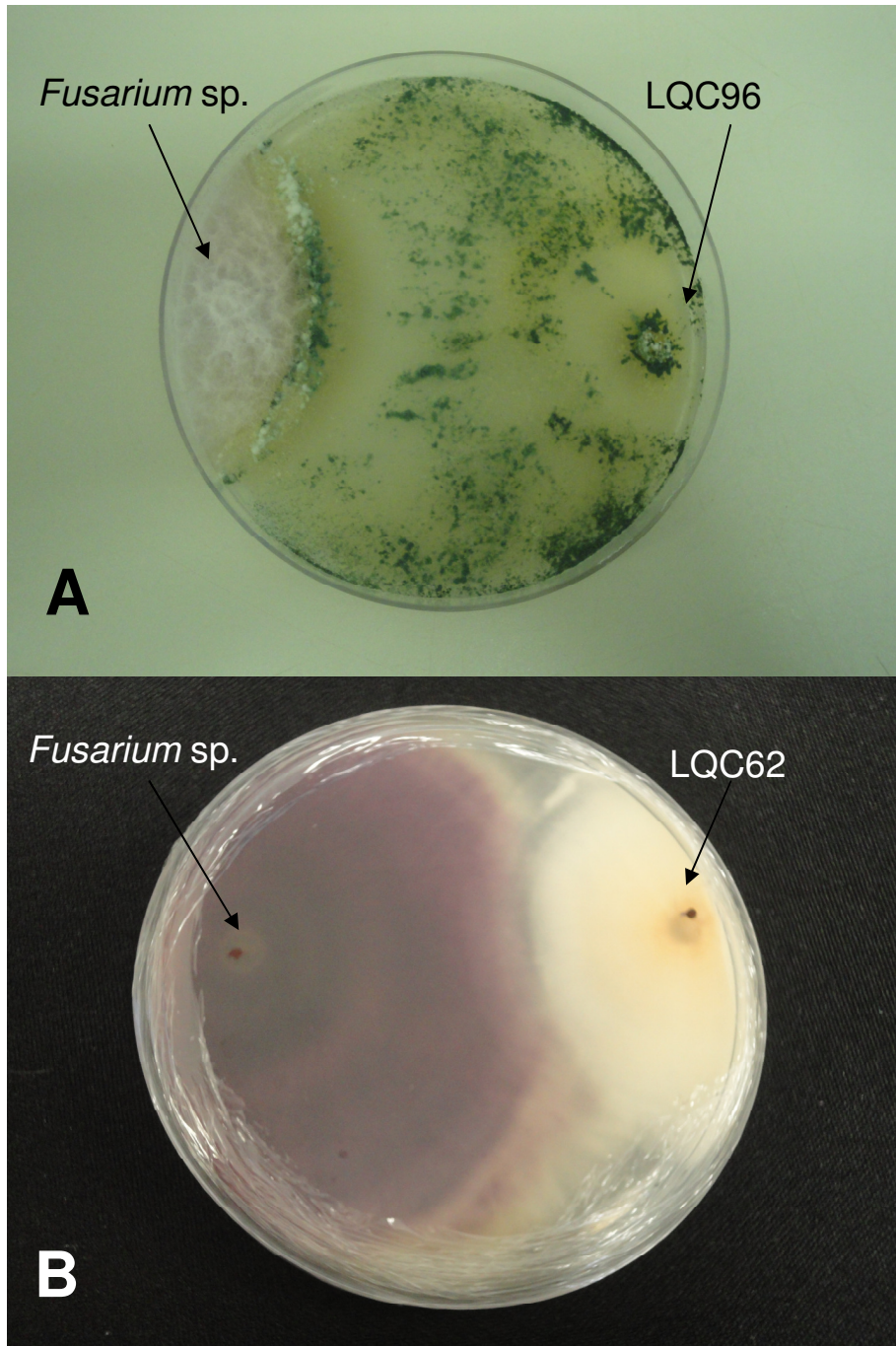


Figura 3. Culturas pareadas. A) *Trichoderma asperellum* LQC96 vs. *Fusarium* sp. e B) *Clonostachys rosea* LQC62 vs. *Fusarium* sp.

3.4. Controle biológico da podridão do colo causada por *Fusarium* sp. no cultivo comercial de begônias

Sintomas da podridão do colo, causada por *Fusarium* sp., foram observados apenas na décima segunda semana após a inoculação, com aumento significativo até o final do ciclo, cuja incidência média de sintomas foi de 40%.

Com relação ao primeiro ensaio, os tratamentos com antagonistas propiciaram os melhores resultados, seguidos do tratamento padrão com consequente redução de 52,38% dos sintomas, no campo. Por outro lado, aplicação única de LQC96 no plantio, via solo, associado com o tratamento padrão, não diferiu estatisticamente da testemunha, mostrando-se ineficiente no controle da doença (t, $P \leq 0,05$) (Tabela 3).

Quanto ao ensaio 2, a maior redução na incidência de sintomas da doença deu-se com aplicação semanal de LQC 62 associado ao tratamento padrão do produtor, redundando em cerca de 70% de controle, seguidos dos demais tratamentos em que os antagonistas foram aplicados semanalmente, via solo e parte aérea. Os demais tratamentos não diferiram da testemunha (t, $P \leq 0,05$) (Tabela 3).

Todos os tratamentos diferiram da testemunha no ensaio 3, proporcionando a redução nos níveis de sintomas da doença (t, $P \leq 0,05$) (Tabela 3). O percentual de controle foi cerca de 30%.

No último ensaio, o tratamento correspondente à aplicação dos antagonistas LQC96 ou LQC62, semanal, via solo e parte aérea, foram os que apresentaram o melhores resultados, com eficiência de controle a ordem de 76,92%. O tratamento correspondente à aplicação de LQC96 via solo, associado com aplicação de LQC62, apresentou resultados intermediários, com 61,54% de controle. Os demais tratamentos não diferiram da testemunha (t, $P \leq 0,05$) (Tabela 3), sendo, pois, ineficientes no controle da podridão do colo em plantas de begônia.

Tabela 3. Incidência de sintomas da podridão do colo causada por *Fusarium* sp. em cultivo comercial de begônia após tratamento com *Clonostachys rosea* LQC62 e *Trichoderma asperellum* LQC96.

Tratamentos ¹	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4
Controle	30,62 A	39,26 A	71,66 A	21,66 A
Padrão	19,16 BC	22,50 ABC	56,66 B	13,33 ABC
LQC62 F	17,50 C	-	-	-
LQC 96 Sol	14,58 C	-	-	-
LQC 96 Sol + Padrão	24,79 AB	-	-	-
LQC 62 SF	-	15,83 BC	54,16 B	5,00 C
LQC 96 SF	-	21,66 BC	50,00 B	5,00 C
LQC 62 SF + Padrão	-	11,66 C	-	16,66 AB
LQC 96 SF + Padrão	-	30,00 AB	-	13,33 AB
LQC 96 S + LQC 62 F	-	-	55,00 B	8,33 BC
LQC 62 S + LQC 96 F	-	-	-	11,66 ABC

¹F (pulverização semanal da parte aérea), Sol (uma única aplicação no plantio via solo), SF (pulverização semanal da parte aérea e aplicação via solo), S (aplicação semanal via solo).

²Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (t, $P \leq 0,05$).

4. DISCUSSÃO

De um modo geral, a identificação de gêneros de fungos pode ser realizada mediante avaliação de caracteres morfológicos, mediante treinamentos prévios e utilização de manuais específicos.

Morfologicamente, *F. foetens* e *F. oxysporum* são muito similares, com exceção de que *F. foetens* produz polifiálides e podem produzir longas monofiálides, nunca foram observadas em *F. oxysporum* (SCHROERS et al., 2004). Além disso, *F. foetens* produz um cheiro distinto em meio BDA. As duas espécies podem ser separadas baseando-se nas sequências de DNA (β -tubulina, fator de elongação 1-alfa e subunidade do ribossomo mitocondrial (ELMER; VOSSBRINCK, 2004). Entretanto, Schroers et al. (2004) verificaram que ambas espécies de *Fusarium* possuem o mesmo padrão de banda RAPD, e, em vista disso, levantaram a

possibilidade de que ambos são, na verdade, clones e não indivíduos geneticamente distintos.

Nesse estudo, os resultados ora obtidos indicam que, de forma semelhante ao apontado por Schroers et al., 2004, o isolado de *Fusarium* sp. assemelha com membros de FOC- *Fusarium oxysporum* specie complex (Complexo de espécies de *Fusarium oxysporum*), dada à presença de monofiálides curtas em micélio aéreo, e de clamidósporos e macroconídios com 3 septos. Em vista disso, presume-se tratar-se de uma forma *especialis* de FOC. Porém, estudos complementares mediante análises filogenéticas indicaram tratar-se de *F. foetens*.

A taxonomia de fungos fitopatogênicos mediante estudos morfológicos e culturais, embora preciso em determinadas situações, em outras mostram-se muito limitadas e imprecisas. O caso de *F. oxysporum*, em especial, pela sua complexidade e grande semelhanças morfológicas com outras espécies do gênero, enquadra-se nesta última categoria (LESLIE E SUMMEREL, 2006). Dessa forma, no presente estudo embora tenha sido detectada similaridade em relação à sequência da região ITS, esta região mostra-se limitada com vistas à identificação de espécies de *Fusarium*. Por outro lado, o emprego de análises da região do fator de elongação 1-alfa ser mostrar-se adequada para identificação de espécies de *Fusarium*, necessita, por outro lado, para maior precisão, ser complementada com análises adicionais, como por exemplo a região do fator de elongação 2-alfa, utilizando-se primers específicos para a espécie alvo (GLEISER et al., 2004; DE WEERDT et al., 2006; SAURAT et al., 2013).

Os agentes de controle biológico possuem vários mecanismos de ação que permitem o controle de microrganismos. Dentre tais alternativas incluem-se micoparasitismo, produção de antibióticos ou enzimas, competição por nutrientes e a indução à formação de defesas da planta (Brimner e Boland, 2003). Desta forma, quanto maior o arsenal empregado pelo antagonista, maior será o nível de eficiência proporcionado no controle dos fitopatógenos.

No presente estudo, observou-se indícios da produção de compostos voláteis e solúveis, além de expressão de atividade hiperparasítica pelos antagonistas, com consequente propriedades inibitórias contra *Fusarium* sp..

Compostos solúveis do isolado de *C. rosea* LQC62 utilizado neste estudo apresentaram atividade antimicrobiana para o patógeno avaliado. Porém, não se observou efeito de compostos solúveis do isolado de *T. asperellum* LQC96 sobre o patógeno. Com relação à produção de compostos voláteis com ação antimicrobiana, LQC96 demonstrou redução de aproximadamente 35% no desenvolvimento de *Fusarium* sp.. No caso de LQC62, a redução foi de cerca de 40% no desenvolvimento do patógeno, segundo todas as variáveis analisadas.

Espécies de *Trichoderma* são consideradas eficientes antagonistas contra uma ampla gama de patógenos de planta, atuando por meio da antibiose, produzindo metabólitos voláteis e solúveis (DENNIS; WEBSTER, 1971b, DENNIS; WEBSTER, 1971c; CAMPOTOTA, 1985; CLAYDON et al., 1987). Neste gênero, há relatos da produção de mais de 40 diferentes metabólitos que, via de regra, podem contribuir no micoparasitismo e ter ação antibiótica (SIVASITHAMPARAM; CHISALBERTI, 1998).

De forma semelhante aos antagonistas do gênero *Trichoderma*, espécies de *Clonostachys* possuem a habilidade de produzir compostos antifúngicos e enzimas que degradam parede celular, induzindo a perda de turgescência das células e lise das hifas do patógeno (PAPAVIZAS, 1985; SUTTON et al., 1997). *Clonostachys rosea*, por exemplo, tem capacidade de parasitar hifas, escleródios e outros tipos de corpos de frutificação de vários fungos fitopatogênicos (SUTTON et al., 1997).

Quando analisado o crescimento das colônias dos agentes antagonistas, em culturas pareadas, verificou-se que a velocidade de crescimento do LQC96 foi superior ao LQC62. Porém, ambos apresentaram abundante número de esporos. Esta característica torna o LQC96 mais competitivo que LQC62, competindo por espaço e nutrientes. Tal observação já havia sido feita por Moraga-Suazo et al. (2011) em culturas pareadas com *Fusarium circinatum*. Esta característica não desclassifica LQC62 como potencial agente de controle biológico, pois mesmo com o crescimento mais lento, foi capaz de sobrepor a colônia de *Fusarium* sp., o que seria outro mecanismo interessante de antagonismo, o hiperparasitismo. Essa característica também foi observada para o LQC96.

Diversos estudos com microscopia eletrônica de varredura e microscopia de fluorescência demonstram que isolados de *Trichoderma* possuem atividade hiperparasítica. Nestes trabalhos foi demonstrado que o parasitismo ocorre por meio de apressórios, ganchos e enrolamento das hifas (ELAD et al., 1983), assim como diversas enzimas líticas extracelulares podem estar envolvidas no parasitismo (MELO; FAULL, 2000; LOPES et al., 2012).

O método de estudo de antagonismos mediante emprego de hastes de begônia é uma adaptação da metodologia que utiliza discos de folhas, desenvolvido para avaliar microrganismos para o controle do mofo cinzento, causado por *B. cinerea* em morango (PENG; SUTTON, 1990; PENG; SUTTON, 1991). Segundo esses investigadores os dados obtidos em campo correlacionaram significativamente com os ensaios em discos de folha, possibilitando à seleção de isolados de *T. viridae* e *C. rosea* eficientes em termos de supressão da esporulação de *B. cinerea*. Entretanto, segundo Sutton et al. (1997), esse efeito pode variar entre os diferentes hospedeiros.

No presente estudo, LQC62 demonstrou capacidade de colonizar eficientemente as hastes de begônia e de reduzir em até 100% a colonização por *Fusarium* sp., quando aplicado preventivamente ou simultaneamente ao patógeno, indicando potencial de controle da doença sob condições comerciais. Quanto a LQC96, este foi eficiente somente nos tratamentos preventivos. A capacidade de colonizar tecidos mortos e o resultado do controle *in vitro* demonstram a sua capacidade competitiva em se estabelecer no ambiente, sobrevivendo por meio de restos culturais.

A colonização das hastes pelos antagonistas e a redução do crescimento dos patógenos foi diretamente proporcional à concentração de conídios dos antagonistas aplicada, cujas melhores respostas foram obtidas às concentrações de 1×10^6 e 1×10^7 conídios.mL⁻¹, com consequente redução da colonização de *Fusarium* sp. Morandi et al. (2001; 2003) também observaram em isolados de *C. rosea* que, nas concentrações mais elevadas, o antagonista foi mais eficiente na competição com *B. cinerea* em discos de folha de roseira.

Nos ensaios de cultivo comercial, de forma geral o tratamento com a aplicação semanal de LQC62 apresentou o melhor resultado, corroborando aos

resultados observados em outras plantas (SUTTON et al., 1997; KÖHL et al., 1998; MORANDI et al., 2003; MORANDI; BETTIOL, 2008; DE WIT et al., 2009; SILVERA-PÉREZ et al., 2010; CHATTERTON; PUNJA, 2012). O número de aplicações de *C. rosea* necessárias para o biocontrole de *B. cinerea* varia segundo o patossistema e as condições ambientais. Cota et al. (2008) realizaram ensaios com *C. rosea* em condições de campo para o controle do mofo cinzento em morango, sendo recomendadas pelo menos duas aplicações semanais de *C. rosea* para o programa de manejo do mofo cinzento em morangos. Já em casa de vegetação, a aplicação semanal de *C. rosea* foi suficiente para o manejo da doença em morangueiro (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 1997), da mesma forma que observado para o mofo cinzento em begônias neste estudo.

A aplicação semanal de LQC96 propiciou bons resultados de controle de *Fusarium* sp., conforme observado no ensaio 4, demonstrando a mesma eficiência que LQC62. A combinação com a aplicação semanal de LQC96 no substrato e LQC62 na parte aérea também apresentou um bom nível de controle da doença. Os tratamentos que tiveram a combinação com químicos e agentes de controle biológico não apresentaram bons níveis de controle da doença, demonstrando que os defensivos agrícolas utilizados pelo produtor possivelmente afetaram negativamente atividade desses antagonistas no controle biológico.

Em conclusão, destaca-se que o isolado de *C. rosea* LQC62 e *T. asperellum* LQC96 foram eficientes no controle da fusariose em begônia em condições controladas e em condições de cultivo.

5. REFERÊNCIAS

- ANUÁRIO BRASILEIRO DAS FLORES. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2007. 112 p.
- BLIND, M.; CEVAT, H.; DERCKX, J. **Ziektebeelden in de bloementeelt**. Misset DLV De landbouwvoorlichting, 1995. p.12-14, 182 p.
- BRAND, T.; WIENBERG, J. Anfälligkeit verschiedener Begonien gegenüber *Fusarium foetens*. Susceptibility of various begonia to *Fusarium foetens*. (in German) **Gesunde Pflanzen**, v. 57, p.27–29, 2005.
- CAVAT, H. De Fusariumziekte: he` t probleem in de begonias. **Vakblad voor de Bloemisterij**, Doetinchem, v. 42, p. 109, 1993.
- DE GRUYTER, J.; AUF`M KELLER, A.; VAN KESTEREN, H. A.; MEFFERT, J. P.; VEENBAAS-RIJKS, J. W.; CEVAT, H. N. *Fusarium sacchari* var. *elongatum* – a serious pathogen of Begonia. **Verslagen Mededeeling Plantenziektenk Dienst**, Wageningen, v. 170, p.76-79, 1994.
- ELAD, Y. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. **Crop Protection**, Oxford, v, 19, p. 709-714, 2000.
- ELAD, Y.; MALATHRAKIS, N. E.; DIK, A. J. Biological control of *Botrytis*-incited diseases and powdery mildews in greenhouse crops. **Crop Protection**, Oxford, v. 15, p. 229-240, 1996.
- ELAD, Y.; SHTIENBERG, D. *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables: chemical, cultural, physiological and biological controls and their integration. **Integrated Pest Management Reviews**, Dordrecht, v. 1, n. 1, p. 15-29, 1995.
- ELAD, Y.; SHTINBERG, D. *Trichoderma harzianum* T39 (Trichodex) integrated with fungicides for the control of grey mould of strawberry, vegetable greenhouse-crops and grapes. In: WENHUA, T.; COOK, R.S.; ROVIRA, A. (Ed.) **Advances in biological control of plant diseases**. Beijing: China Agricultural University Press, 1996. p. 310-319.
- ELAD, Y.; WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, B.; DELEN, N. *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems - an introduction. in: ELAD, Y., WILLIAMSON, B., TUDZYNSKI, B., DELEN, N. (Eds.), **Botrytis: Biology, Pathology and Control**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, pp. 1-8, 2004.
- ELMER, W. H. Preventing spread of *Fusarium* wilt of Hiemalis begonias in the greenhouse. **Crop Protection**, Oxford, v. 27, p. 1078-1083, 2008.
- ELMER, W. H.; VOSSBRINCK, C.; GEISER, D. M.. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, n. 11, p. 1287, 2004. First report of a wilt disease of Hiemalis Begonias caused by *Fusarium foetens* in the United States. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.11.1287B>>.

ELMER, W.H.; MCGOVERN, R.J. Efficacy of integrating biologicals with fungicides for the suppression of *Fusarium* wilt of cyclamen. **Crop Protection**, Oxford, v.23, p.909-914, 2004.

FUJINAWA, M. F.; PINTO, Z. V.; VILELA, E. S. D.; PIERMANN, L. Avaliação da atividade celulolítica de agentes de controle biológico. In: V COBRADAN Congresso Brasileiro de Defensivos Agrícolas Naturais, Jaguariúna SP. **Anais do V COBRADAN**, Jaguariúna. p.5, 2011.

FUJINAWA, M.F., SANTOS, N.F., PONTES, N.C., GOES, A., MORANDI, M.A.B., HALFELD-VIEIRA, B.A. Primeiro relato de *Myrothecium* sp. causando mancha foliar em begônia no Brasil. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa, v. 37S, 2012b.

FUJINAWA, M.F.; PONTES, N.C.; SOUZA, E.S.C.; GOES, A.; VALE, H.M.M. First report of *Lasiodiplodia theobromae* causing stem rot disease of begonia (*Begonia x elatior* hort.). **Australasian Plant Disease Notes**, v. 7, p. 163-166, 2012a.

JARVIS, W. R. **Managing diseases in greenhouse crops**. Harrow: APS Press, 1992. 288 p.

JARVIS, W. R. Managing diseases in greenhouse crops. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 73, p. 190-194, 1989.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Mercado interno para os produtos da floricultura brasileira: características, tendências e importância socioeconômica recente. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 37-52, 2008.

MCQUILKEN, M. P.; GEMMELL, J.; LAHDENPERA, M. L. *Gliocladium catenulatum* as a potential biological control agent of damping-off in bedding plants **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 149, n. 3-4, p. 171-178, 2001.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Integração de métodos biocompatíveis no manejo de doenças e pragas: experiência em plantas ornamentais e medicinais. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 33, supl., p. 31-34, 2008.

MORANDI, M. A. B.; MAFFIA, L. A.; SUTTON, J. C. Development of *Clonostachys rosea* and interactions with *Botrytis cinerea* in rose leaves and residues. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 29, p. 1-11, 2001.

MORANDI, M. A. B.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G.; ALFENAS, A. C.; BARBOSA, J. G.; CRUZ, C. D. Relationships of microclimatic variables to colonization of rose debris by *Botrytis cinerea* and the biocontrol agent *Clonostachys rosea*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 16, p. 619-630, 2006.

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

NIRENBERG, H.I.; O'DONNELL, K. New *Fusarium* species and combination within the *Gibberella fujikuroi* specie complex. **Mycologia**, Nova York, v.90, p.434-483, 1998.

O'NEILL, T. M.; BENNISON, J. A.; SCRACE, J. M. Pests and diseases of protected ornamental flower. In: ALFORD, D. (Ed.). **Pest and disease management handbook**. Oxford: Blackwell Science, 2000. p. 374-428.

PAULITZ, T. C.; BÉLANGER, R. R. Biological control in greenhouse systems. **Annual Review Phytopathology**, v. 39, p. 103-133, 2001.

PENG, G.; SUTTON, J. C. Biological methods to control grey mould of strawberry. **Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases**, Alton, v. 1, p. 233-240, 1990.

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

PIMENTEL-GOMES, F.; GARCIA, C. H., Estatística aplicada a experimentos agrônômicos e florestais. Fealq, Piracucaba, p.309. 2002

QUEZADO-DUVAL, A.M., HENZ, G.P., PAZ-LIMA, M.L., MEDEIROS, A.R., MIRANDA, B.E.C., PFENNING, L.H., REIS, A. New hosts of *Myrothecium* spp. in Brazil and a preliminary in vitro assay of fungicides. **Brazilian Journal of Microbiology** v. 41, p. 246-252, 2010.

RODRIGUEZ, M.A.; CABRERA, G.; GOZZO, F.C.; EVERLIN, M.N.; GODEAS, A. *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. **Journal Applied Microbiology**, v.110, p.1177-1186, 2011.

SCHROERS, H. J.; BAAYEN, R. P.; MEFFERT, J. P.; DE GRUYTER, J.; HOOFTMAN, M.; O'DONNELL K. *Fusarium foetens*, a new species pathogenic to begonia elatior hybrids (*Begonia · hiemalis*) and the sister taxon of the *Fusarium oxysporum* species complex. **Mycologia**, New York, v. 96, p. 393-406, 2004.

SILVERA-PÉREZ, A. E.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; DUARTE, V.; SANTOS, H. P.; FELIPPETO, J. Controle do mofo cinzento com *Clonostachys rosea* na produção de mudas de fúcsia. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 35, p. 163-169, 2010.

SOMEYA, N.; KATAOKA, N.; KOMAGATA, T.; HIRAYAE, K.; HIBI, T.; AKUTSU, K., Biological Control of Cyclamen Soilborne Diseases by *Serratia marcescens* Strain B2. **Plant Disease**, Saint Paul, v.84 3 p. 334-340, 2000.

YOURMAN, L.F.; JEFFERS, S.N. Resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, p.569-575, 1999.

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

ZIMAND, G.; ELAD, Y.; CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, p. 1255-1260, 1996.